

Terapêuticas Antigénio-Específicas no Tratamento das Doenças Desmielinizantes

*Estudos sobre a Vacinação com ADN e a
Descoberta de um Novo Alvo Antigénico*

PAULO PACHECO DA FONTOURA



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LISBOA
2007

**DISSERTAÇÃO PARA CANDIDATURA
AO GRAU DE DOUTOR EM MEDICINA
NA ESPECIALIDADE DE NEUROLOGIA**



ORIENTADOR

PROFESSOR DOUTOR JOAQUIM ANTÓNIO MACHADO CAETANO
*Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Nova de Lisboa, Portugal.*

CO-ORIENTADOR

PROFESSOR LAWRENCE STEINMAN
*Department of Neurology and Neurological Sciences, Interdepartmental
Program in Immunology, Stanford University School of Medicine,
California, EUA.*

À Mónica, pelo Amor
Ao Pedro e à Catarina, pela Esperança
À Anabela e ao Luís, pelo Exemplo

“A ineficácia das terapêuticas habitualmente empregadas na Esclerose em Placas é por de mais conhecida. [...] A ineficácia desta resulta, como é natural, da falta de um fundamento etiológico. Reinam, com efeito, as maiores indecisões no que refere à etiologia da Esclerose em Placas [...]”.

Diogo Furtado (1946)

“A Esclerose em Placas, conhecida há mais de um século [...] estudada intensivamente em todos os serviços de neurologia desde então, continua sem etiologia esclarecida e nenhuma terapêutica é capaz de alterar sequer o ritmo da sua evolução espontânea”.

Pedro Almeida Lima (1954)

AGRADECIMENTOS

RESUMO · ABSTRACT · RÉSUMÉ · ZUSAMMENFASSUNG





PRIMEIRA PARTE

✧ Capítulo I	Abordagem Clínica, Etiopatogénica e Imunopatológica da Esclerose Múltipla e Doenças Desmielinizantes.	1
1.	Introdução. A Esclerose Múltipla como doença desmielinizante primária. Epidemiologia, manifestações e subtipos clínicos. História natural da doença.	2
2.	Diagnóstico, critérios de diagnóstico, biomarcadores e diagnóstico diferencial. Heterogeneidade clínica e geográfica: o espectro das doenças desmielinizantes.	11
3.	Etiopatogénese da Esclerose Múltipla – o Modelo Padrão. Modelos experimentais: a Encefalomielite Autoimune Experimental. Estudos genéticos e etiologias infecciosas.	28
4.	Caracterização histopatológica das lesões de Esclerose Múltipla e heterogeneidade patológica. Mudanças de paradigma etiopatogénico com base na patologia.	47
5.	Imunopatologia da Esclerose Múltipla. Conceitos de autoimunidade. Componentes principais da resposta imune inata e adaptativa, e antígenios-alvo. Dinâmica da reacção autoimune.	57
6.	Conclusões.	77
7.	Bibliografia.	78
✧ Capítulo II	Evolução dos Conceitos Etiopatogénicos na Esclerose Múltipla e o Desenvolvimento dos Modelos Animais de Doença Desmielinizante.	95
1.	A definição nosológica da Esclerose Múltipla. Breves notas históricas sobre as primeiras descrições da doença, sua definição e evolução dos conceitos etiopatogénicos iniciais.	96
2.	Da teoria infecciosa à teoria tóxica e alérgica. A vacinação anti-rábica, os acidentes pós-vacinais, e o aparecimento de modelos experimentais de doenças desmielinizantes.	107
3.	Anafilaxia, alergia e autoimunidade. A evolução do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental e a utilização de adjuvantes. A EAE como doença mediada por hiperimunidade celular.	125
4.	Estudos sobre o carácter antigénico da mielina. Do isolamento das fracções antigénicas à caracterização dos antígenios proteicos e a definição dos determinantes antigénicos para cada espécie.	143
5.	Da caracterização dos antígenios de mielina à identificação do complexo trimolecular nos modelos experimentais e na Esclerose Múltipla. A identificação de clones linfocitários anti-mielina e a restrição de repertório TCR. Modelos transgénicos de EAE espontânea.	157
6.	A heterogeneidade da resposta imune: degeneração de reconhecimento e de apresentação, mimetização molecular e diversificação de epítomos. Caracterização estrutural do complexo trimolecular. Implicações para a imunopatogénese e terapêuticas antígeno-específicas.	170
7.	Conclusões.	192

	8. Bibliografia.	194
Capítulo III	Desenvolvimento de Terapêuticas Baseadas em Antígenos para a Prevenção e Tratamento das Doenças Desmielinizantes Primárias.	213
1.	Introdução. Terapêutica da Esclerose Múltipla: terapêutica multidisciplinar, farmacológica e não-farmacológica da Esclerose Múltipla. Seguimento dos doentes. Estado actual das terapêuticas imunomoduladoras modificadoras da doença, e alvos terapêuticos emergentes. Terapêuticas antígeno-específicas e não antígeno-específicas.	214
2.	Terapêuticas antígeno-específicas na EAE e EM: imunomodulação no complexo trimolecular. Nota histórica sobre o desenvolvimento das terapias baseadas em antígenos no modelo de EAE.	223
3.	Administração de mielina e seus componentes como terapia antígeno-específica. Terapêuticas parentéricas, tolerização oral e nasal, complexos MHC-mielina e proteínas de fusão.	228
4.	Desenvolvimento de copolímeros terapêuticos. O acetato de glatíramero (AG) e seus mecanismos de acção. Novos copolímeros baseados na estrutura molecular do MHC.	236
5.	Modificação de antígenos com efeitos imunomoduladores: ligandos peptídeos alterados. Desenvolvimento na EAE e ensaios clínicos na EM.	249
6.	Vacinação com ADN codificador de proteínas da mielina: imunomodulação para além das proteínas e péptidos. Construção, produção, mecanismos de acção e aplicações das vacinas de ADN. Utilização em modelos experimentais de autoimunidade.	257
7.	Bibliografia.	267

SEGUNDA PARTE

Capítulo IV	Utilização de Vacinas de ADN Codificadoras de Antígenos de Mielina como Terapêutica Antígeno-Específica no Modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental.	279
1.	Introdução e antecedentes. Objectivos e plano experimental.	280
2.	Vacinação com ADN codificador de epítomos da proteína MOG para a prevenção da EAE crónica em ratinhos C57BL/6.	285
3.	Mecanismos de acção da vacina codificadora de IL-4.	292
4.	Co-vacinação com o minigene PLP139-151 e IL-4 na prevenção da EAE crónica induzida em ratinhos SJL/J.	296
5.	Necessidade da presença de STAT6 para o efeito terapêutico da co-vacinação com o constructo IL-4.	302
6.	Tratamento da EAE estabelecida através de co-vacinação com constructos de ADN codificadores de MOG e IL-4.	304
7.	Tratamento de formas crónicas de EAE com vacinação com ADN codificador de múltiplos genes de mielina: vacinação multigénica ou de <i>cocktail</i> .	309
8.	Utilização de vacinação multigénica/ <i>cocktail</i> com ADN codificador de proteínas de mielina na prevenção de modelos de EAE crónica.	337
9.	Efeitos imunomoduladores do ADN bacteriano: utilização de sequências imunoestimuladoras e imunossupressoras na prevenção e tratamento da EAE.	341
10.	Terapêutica de combinação de vacinação com ADN codificador de proteínas de mielina e oligonucleótidos imunomoduladores	354

	no tratamento de modelos crónicos de EAE.	
11.	Bibliografia.	371
 Capítulo V	Identificação da Proteína Inibidora do Recrescimento Axonal, Nogo-A, Como Autoantígeno no Modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental.	375
1.	Introdução e antecedentes. Objectivos e plano experimental.	376
2.	Estudos em modelos <i>knockout</i> para a proteína Nogo.	381
3.	Estudos de estrutura molecular primária da região Nogo-66 e comparações com outras proteínas de mielina.	389
4.	Estudos de comparação de homologia da proteína Nogo-A com outras proteínas de mielina, e estudos de previsão de locais de ligação a moléculas de apresentação de antígeno do complexo MHC.	395
5.	Indução de respostas linfocitárias T (proliferação e fenotipagem Th) e de Encefalomielite Autoimune Experimental em estirpes susceptíveis de ratinho a partir de péptidos da sequência Nogo-66.	403
6.	Indução de respostas linfocitárias B contra péptidos da sequência Nogo-66 e demonstração de diversificação de epítomos para outros antígenos de mielina.	412
7.	Especificidade da resposta linfocitária T contra péptidos Nogo-66, estudos de reactividade cruzada com outros antígenos de mielina e de diversificação de epítomos da resposta T.	426
8.	Tentativas de indução de EAE por transferência adoptiva de linhas celulares anti-Nogo, estudos de marcadores de activação e memória, transferência de linhas celulares anti-Nogo para tratamento da EAE estabelecida.	431
9.	Mapeamento dos epítomos dominantes dos péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66 para a resposta linfocitária T nas estirpes SJL/J e C57BL/6.	454
10.	Construção de vacinas de ADN a partir das sequências da proteína Nogo.	457
11.	Bibliografia.	460
 Capítulo VI	Materiais e Métodos.	463
TERCEIRA PARTE		
 Capítulo VII	Discussão dos Resultados Experimentais.	493
1.	Vacinação com ADN codificador de proteínas de mielina na prevenção e tratamento da Encefalomielite Autoimune Experimental. Discussão dos resultados, revisão da literatura e proposta de mecanismos de acção.	494
2.	Identificação da proteína Nogo-A como novo autoantígeno na Encefalomielite Autoimune Experimental. Discussão dos resultados, revisão da literatura e implicações para a fisiopatologia da Esclerose Múltipla.	526
3.	Bibliografia.	562
 Capítulo VIII	Conclusões e Perspectivas Futuras.	575
ÍNDICE REMISSIVO		581

∞ AGRADECIMENTOS

“A good clinical teacher is himself a Medical School”

Oliver Wendell Holmes (1809-1894)

“Man can learn nothing except by going from the known to the unknown”

Claude Bernard (1813-1878)

“Experiment alone crowns the efforts of Medicine,
experiment limited only by the natural range of the powers of the human mind”

Ivan Pavlov (1849-1936)

A dissertação que vimos, desta forma, submeter a julgamento académico e público, é o resultado de alguns anos de atenta reflexão e de rigoroso trabalho experimental e é, ainda e sobretudo, a resultante natural de um percurso de 18 anos, iniciado após sermos admitidos na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, orientados e acarinhados, no dia-a-dia, por Mestres insígnies e Colegas de Excepção, que sempre nos ampararam nas dúvidas, nas hesitações, nos desânimos e nos desenganos de uma marcha complexa, exigente e exclusivista.

Desde cedo considerámos a vida académica, com o seu postulado de dedicação à investigação e ao ensino, uma das expressões mais nobres da Arte Médica, a par, naturalmente, da prática clínica, sempre renovada nas imediações da Vida e da Morte. Acresce que, sobretudo neste momento, ser-se clínico implica, por necessidade, quando não por prazer, uma cada vez mais íntima convivência com as ciências biológicas mais puras.

Realmente, a Revolução da Medicina Molecular, que tem possibilitado o aprofundamento da compreensão dos fenómenos fisiológicos e fisiopatológicos, com uma pormenorização até há pouco inexpectável, refundou, como poucas vezes até aqui, as bases mais essenciais da Ciência Médica. Torna-se, por isso, cada vez mais necessário que os clínicos tenham uma sólida formação em Medicina Experimental e, mesmo, em alguns casos, que sejam verdadeiros clínicos-cientistas, na melhor tradição, aliás, dos Mestres que, no somar dos Séculos, foram sistematizando, consolidando e aperfeiçoando a Arte de curar.

Foi um deslumbramento, a nossa chegada à Faculdade de Ciências Médicas, para a aprendizagem inicial de uma Arte que nunca tivera confrontos nas escolhas de vida. Ao longo desses anos de licenciatura o nosso interesse pela vida académica foi sendo estimulado, sucessivamente, pelo contacto, através da mão segura e sabedora dos nossos Professores, com as várias áreas de conhecimento que integram o Curso. Entre as ciências básicas, a Anatomia e a Imunologia foram duas paixões imediatas. A primeira, pelo seu rigor formativo, nuclear, e pelo fascínio Renascentista da descoberta da fábrica do corpo humano, dos seus escaninhos e segredos; a segunda, pela sua intrigante complexidade e fascinante evolução, acompanhando o nascer das novas disciplinas do saber médico. Se quisermos, portanto, a Anatomia como símbolo da Medicina Clássica, a Imunologia, da Medicina Moderna, no que estas de melhor têm para oferecer.

Por outro lado, as neurociências foram, sempre, o ponto axial das nossas preocupações, e o contacto estreito com a clínica neurológica impressionou a nossa sensibilidade e despertou a nossa inteligência, pela síntese que logra fazer entre a dedicação absoluta e intensa ao doente e o olhar científico sobre a fenomenologia clínica. A súplica destas devoções conduziu-nos, e felizmente, à Neurologia, como especialidade clínica, e à Neuroimunologia como área privilegiada de investigação.

Dispusemos da felicidade de, desde muito cedo neste percurso académico, poder participar no ensino e na investigação que nesta Casa se concretiza. Nesse labor encontrámos e, depois, aprofundámos, o gosto e o interesse pela investigação científica, e aí aprendemos, também, a humildade que deve guiar os nossos passos perante a imensidão incalculável do que ainda está por saber. Quando, mais tarde, tivemos a oportunidade única de dedicarmos, sem outras preocupações, um período de tempo prolongado à investigação fundamental em Neuroimunologia, num centro de renome mundial, encarámo-la como a possibilidade de cumprir as nossas aspirações. Dessa forma, e nessa altura, fizemos as investigações, os estudos, as reflexões que constituem, a final, o trabalho que trazemos a Júri. Também como resultado dessa permanência, saiu

reforçada a nossa convicção nas virtudes da combinação entre a Medicina Clínica e a Medicina Experimental, na génese das futuras gerações de médicos que, continuando a luta pela Saúde e pelo Bem-Estar da Humanidade, persistirão em varar as fronteiras do conhecimento.



Agradecer a quem me ajudou neste já longo caminho é, mais do que um estrito dever e uma indeclinável obrigação moral, um prazer. Tive a felicidade de contactar, em diversas circunstâncias deste andar académico, com Mestres e Colegas que me distinguiram com a sua Amizade e Sabedoria, uma e outra para mim indispensáveis. Gostaria, de forma singela, prestar-lhes, aqui, uma pequena, mas sincera, homenagem.

No Departamento de Anatomia desta Faculdade, onde iniciei a minha vida académica: ao Professor Doutor José António Rebocho Esperança Pina, seu Director, devo, para além da generosidade com que me acolheu e apadrinhou nesta Casa, o exemplo de quem, com dedicação constante à investigação e ensino, mesmo na adversidade quotidiana, vive intensamente e com grandeza, o mister do professorado. Agradeço, igualmente, a todos os outros membros do Departamento, em especial ao Prof. Doutor Diogo de Freitas Branco Pais, e ao Dr. Miguel Casimiro, pela sua amizade plena e sincera, dentro e fora das lides da ciência.

No Departamento de Imunologia desta Casa, onde tenho o prazer e a honra de, actualmente, trabalhar, agradeço: ao Professor Doutor Joaquim António Machado Caetano, meu Mestre e Orientador, figura maior da escola de Imunologia portuguesa, que já tantos proveitos deu à ciência e clínica nacionais, pelo seu incentivo e apoio constantes em todas as circunstâncias, e por manter viva, em mim, a vontade de insistir neste percurso académico. Ao Prof. Doutor Hélder Trindade, seu actual Director, a sua generosidade e entusiasmo pela investigação, e empenho na continuação da obra que lhe foi legada. Aos restantes membros do

Departamento, em especial às Doutoradas Isabel Abreu, Paula Videira e Teresa Barona, às Dr.^{as} Carmén Algueró Martín e Helga Guimarães, e à Raquel Gomes, agradeço o companheirismo e a amizade.

No Laboratório Steinman, no Departamento de Neurologia e Ciências Neurológicas da Universidade de Stanford: ao Professor Lawrence Steinman, meu Mestre e Orientador, devo a ventura de me considerar, hoje, um investigador. A sua abertura sem limites, capacidade imaginativa, confiança generosa, e orientação sábia e rigorosa, fizeram nascer, em mim, até aí insuspeitos dotes para a experimentação, e a capacidade de descortinar, no horizonte da ciência, novas oportunidades. Ainda no seu laboratório, agradeço aos Doutores Hideki Garren, Pedro Ruiz, William Robinson, Peggy Ho, Guy Hermans, Raymond Sobel, Rosetta Pedotti e Dorothée Chabas, e a Jason DeVoss, Dennis Mitchell, Mae Lim e Teri Montgomery, pela sua ajuda e camaradagem.

No Instituto Gulbenkian de Ciência em Oeiras, agradeço ao Professor Doutor António Coutinho por ter sido, sempre, um facilitador da minha vocação de cientista; inicialmente, ao orientar-me para a Universidade de Stanford, e, no regresso, por me honrar com a oportunidade de trabalhar no Instituto que dirige. Aos membros do Laboratório de Inflamação, especialmente ao Doutor Miguel Soares, Dr. Ângelo Chora e Dr.^a Andreia Cunha, manifesto o meu apreço e admiração, e os votos de sucessos conjuntos futuros.

Aos restantes Professores e Colegas, com quem privei ao longo dos anos e que, com o seu exemplo e conhecimento, contribuíram para a minha formação, expresso a minha gratidão e amizade.



No Serviço de Neurologia do Hospital Egas Moniz, onde fiz a meu Internato da Especialidade: ao Prof. Dr. Orlando Leitão, meu Mestre na

Teoria e na Arte, devo o exemplo de dedicação abnegada ao trabalho clínico, à cabeceira do doente, bem como da capacidade de liderança, baseada na compreensão das limitações e potencialidades de cada um. Ao Dr. João Guimarães, agradeço o incentivo constante e as oportunidades que me proporcionou para que me dedicasse à investigação na minha área. Aos meus Colegas neurologistas, em especial ao Dr. José Vale, meu mentor clínico, e aos Drs. Miguel Viana Baptista e Nuno Canas, agradeço os conselhos e encorajamento constante.

No Serviço de Neurologia do Hospital de São Bernardo, onde actualmente trabalho, quero deixar expressa a minha admiração e gratidão ao Dr. José Fernando Pinto Marques, seu Director, pela generosidade e abertura com que me permitiu dedicar-me à elaboração deste trabalho. Aos restantes membros deste Serviço, particularmente ao Dr. Rui Guerreiro, interno da especialidade que tutelo, e à Enf.^a Idaulina Silva, com quem divido responsabilidades na consulta de Esclerose Múltipla e Doenças Desmielinizantes, manifesto a minha amizade e respeito.

Tem sido meu privilégio, ao longo dos anos, poder participar no tratamento de doentes com Esclerose Múltipla, e outras patologias neurológicas, e de beneficiar com os seus ensinamentos. Estou grato por tudo o que os meus doentes me têm dado, de si mesmo e do seu sofrimento, ao mesmo tempo que espero ter retribuído, pelo menos, na mesma medida.



Às entidades que me honraram com o seu patrocínio, e que me permitiram desenvolver os trabalhos experimentais aqui descritos, agradeço a sua confiança, nomeadamente à Fundação Calouste Gulbenkian, Fundação Luso-Americana, Fundação Fulbright, *Roman Reed Foundation* e *Christopher Reeve Paralysis Foundation*.



À minha Mulher, Mónica, agradeço todo o amparo, dedicação, ternura, compreensão e tolerância, ao longo dos anos deste trabalho. Acima de tudo, surpreendi-lhe um empenho neste projecto equiparável ao meu, de tal forma que, nos momentos de maior desânimo, foi a sua força e persistência que me fizeram querer superar as dificuldades, e manter o rumo. Não lhe conheço maior expressão do seu Amor, do que ter abandonado a sua vida e suas obrigações, para fazer, das minhas, as suas prioridades.

Aos meus pais, Anabela e Luís, reconheço a dívida insolvível da minha formação como Homem. A minha mãe incutiu-me a generosidade, a gentileza e a sensibilidade para me dedicar ao Outro, e a certeza de que pouco está para além da força da nossa vontade. O meu pai formou-me no rigor inabalável da aprendizagem, no perfeccionismo do carácter, na insatisfação com o razoável e o mediano, e na ambição imaginativa de horizontes longínquos. Espero poder, um dia, comparar-me favoravelmente aos seus Exemplos do que é ser-se um educador.

A todos os restantes membros da minha Família, e aos meus Amigos, agradeço o amor, a amizade e o carinho incessantes. Em especial, ao meu irmão Miguel, alma superior em nobreza e elevação, agradeço a cumplicidade nos ideais e nos gostos, e a dedicação e ternura fraternas.

Por último, aos meus filhos, Pedro e Catarina, devo a alegria terna e tranquila, o deslumbramento e a Esperança de quem acompanha dois novos seres na descoberta do Mundo, e, nessa tarefa encontra, inesperadamente, a satisfação das suas ambições.

Lisboa, Janeiro de 2007

Paulo da Fontoura

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença desmielinizante crônica do Sistema Nervoso Central (SNC), provocada, em grande parte, por um ataque imuno-mediado contra diversos elementos da bainha de mielina. Dentro dos alvos antigénicos desta resposta autoimune, vários componentes proteicos e lipídicos da mielina têm vindo a ser identificados ao longo dos anos, entre os quais se destacam a proteína básica de mielina (MBP), glicoproteína oligodendrocitária da mielina (MOG), proteína proteolipídica (PLP) e glicoproteína associada à mielina (MAG). Com o desenvolvimento do modelo animal de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), diversas terapias antigénio-específicas foram desenhadas, baseadas na modificação benéfica da resposta autoimune contra a mielina, tais como a administração de mielina ou seus componentes, os copolímeros terapêuticos, os ligandos peptídeos alterados e, recentemente, a vacinação com ácido desoxirribonucleico (ADN) codificador de proteínas de mielina, integrado em plasmídeos e purificado para administração parentérica.

Neste trabalho, apresentamos os resultados de um extenso conjunto de experiências, subordinadas a dois temas fundamentais: 1) avaliação do potencial terapêutico, e dos mecanismos de acção, da vacinação tolerizadora com ADN codificador de proteínas de mielina (MBP, MOG, PLP, MAG) na EAE, e da associação desta vacinação com a administração de ADN de citocinas Th2, ou de oligonucleótidos imunomoduladores; 2) identificação e caracterização da resposta imune contra um novo componente da mielina com potencial antigénico, a proteína inibidora do recrescimento axonal, Nogo-A.

No que respeita à vacinação com ADN, os nossos resultados comprovam a eficácia desta terapêutica antigénio-específica na prevenção e tratamento da EAE. Os seus mecanismos de acção incluem, entre outros, a supressão anérgica da proliferação antigénio-específica dos linfócitos T anti-mielina (no modo de prevenção da doença), o enviesamento Th2 da resposta imune (quando co-administrada com a vacina de ADN codificadora da citocina IL-4, funcionando como terapia génica local), e a redução da diversificação de epítomos da resposta humoral anti-mielina, avaliada através de *myelin spotted arrays*. A associação das vacinas de ADN com oligonucleótidos imunomoduladores GpG, desenvolvidos para contrariar as sequências CpG imunoestimuladoras presentes no vector de vacinação, levou à melhoria da sua eficácia terapêutica, devida, provavelmente, ao efeito estimulador preferencial dos oligonucleótidos GpG sobre linfócitos Th2 e sobre células reguladoras NK-T. Com base nestes resultados a vacinação com ADN foi desenvolvida para o tratamento da EM em humanos, com ensaios clínicos a decorrerem neste momento.

Em relação à proteína Nogo-A, estudos de estrutura primária e de previsão de antigenicidade identificaram a região Nogo-66 como alvo antigénico potencial para a EAE. Nas estirpes de ratinho SJL/J e C57BL/6, fomos capazes de induzir sinais clínicos e histológicos de EAE após imunização com os epítomos encefalitogénicos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66, utilizando protocolos de quebra de tolerância imune. Ao mesmo tempo, identificámos e caracterizámos uma resposta linfocitária T específica contra os antigénios contidos na região Nogo-66, e uma resposta linfocitária B com diversificação intra e intermolecular a vários determinantes presentes noutras proteínas da mielina. A transferência adoptiva de linhas celulares Th2 anti-Nogo45-66, levou à melhoria clínica e histológica da EAE em animais recipientes induzidos com outros antigénios de mielina, após migração destas células para o SNC. Estes dados comprovam a importância da Nogo-66 como antigénio na EAE, e a eficácia de terapias antigénio-específicas nela baseadas.

No seu conjunto, os nossos resultados confirmam o potencial terapêutico das vacinas de ADN codificadoras de proteínas de mielina, bem como a importância dos encefalitogénios contidos na proteína Nogo-A para a fisiopatologia da EAE e da EM, com eventual relevância para o desenvolvimento de novas terapias antigénio-específicas. O aperfeiçoamento futuro destas terapias poderá levar, eventualmente, a uma capacidade de manipulação da resposta imune que permita o tratamento eficaz das doenças inflamatórias desmielinizantes, como a Esclerose Múltipla.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS), caused, mainly, by an immune-mediated attack against several elements of the myelin sheath. Among the antigenic targets for this autoimmune response, several proteic and lipidic myelin components have been identified throughout the years, of which myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), proteolipidic protein (PLP), and myelin associated glycoprotein (MAG) are the best characterized. With the development of the animal model for MS, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), several antigen-specific therapies have been designed, based on beneficial modifications of the autoimmune response against myelin. These have included myelin and myelin component administration, therapeutic copolymers, altered peptide ligands and, more recently, vaccination with myelin-protein encoding deoxyribonucleic acid (DNA), integrated into plasmids and purified for parenteral administration.

In this work we present the results of an extensive series of experiments, subordinate to two fundamental areas: 1) evaluating the therapeutic potential, and mechanisms of action, of tolerizing myelin protein (MBP, MOG, PLP, MAG) DNA vaccination in EAE, alone and in association with Th2 cytokine DNA administration, or immunomodulatory oligonucleotides; 2) identifying and characterizing the immune response against a new myelin component with antigenic potential, the axonal regrowth inhibitor Nogo-A.

Regarding DNA vaccination, our results prove the efficacy of this antigen-specific therapy for the prevention and treatment of EAE. Its mechanisms of action include, among others, anergic suppression of antigen-specific T-cell proliferation against myelin (in prevention mode), Th2 biasing of the immune response (when co-administered with the IL-4 codifying DNA vaccine, acting as local gene therapy), and reduction of epitope spreading of the anti-myelin antibody response, assessed by myelin spotted arrays. The combination of myelin DNA vaccination with the administration of GpG immunomodulatory oligonucleotides, designed to counteract immunostimulatory CpG motifs present in the vaccination vector, led to an improvement in therapeutic efficacy, probably due to the preferential stimulatory effect of GpG oligonucleotides on Th2 lymphocytes and on regulatory NK-T cells. Based on these results, tolerizing DNA vaccination is being developed for human use, with ongoing clinical trials.

As concerns the Nogo-A protein, based on studies of primary structure and prediction of antigenicity, we identified the Nogo-66 region (responsible for the most of the inhibitory capacity of this protein) as a potential antigenic target for EAE. In the SJL/J and C57BL/6 mouse strains, we were able to induce clinical and histological signs of EAE, after immunization with the encephalitogenic epitopes Nogo1-22, Nogo23-44 and Nogo45-66, using a tolerance breakdown protocol. Concomitantly, we identified and characterized a specific T cell response against these antigens, together with a B cell response which showed extensive intra and intermolecular epitope spread to several determinants present in other myelin proteins. Adoptive transfer of anti-Nogo45-66 Th2 cell lines resulted in clinical and histological improvement of EAE in recipient animals induced with other myelin antigens, after intraparenchymal CNS migration of anti-Nogo cells. These data confirm the relevance of Nogo-66 as an antigen in EAE, as well as the efficacy of antigen-specific therapies based on the response against this protein.

In conclusion, our results substantiate the therapeutic potential of myelin-encoding DNA vaccination, as well as the importance of encephalitogenic epitopes present in the Nogo-A protein for the pathophysiology of EAE and MS, with potential relevance for the creation of new antigen specific-therapies. The future development of these therapies may eventually lead to a degree of manipulation of the immune response that allows the effective treatment of autoimmune, inflammatory, demyelinating diseases, such as Multiple Sclerosis.

RÉSUMÉ

La Sclérose en Plaques (SP) est une maladie démyélinisante chronique du Système Nerveux Central (SNC), provoquée, en grande partie, par une attaque immuno-médiée contre les différents éléments de la gaine de myéline. Parmi les cibles antigéniques de cette réponse auto-immune, plusieurs composants protéiques et lipidiques de la myéline ont été identifiées, comme la protéine basique de myéline (MBP), glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG), protéine protéolipidique (PLP) et glycoprotéine associée à la myéline (MAG). Avec le développement du modèle animal de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), plusieurs thérapies antigène-spécifiques furent dessinées, basées dans la modification bénéfique de la réponse auto-immune contre la myéline, comme l'administration de myéline, les copolymères thérapeutiques, les ligands peptidiques altérés et, récemment, la vaccination avec de l'acide desoxyribonucléique (ADN) codificateur de protéines de myéline.

Dans ce travail, nous présentons les résultats d'un étendu groupe d'expériences, subordonnés à deux thèmes fondamentaux : 1) évaluation du potentiel thérapeutique, et des mécanismes d'action, de la vaccination tolératisatrice avec de l'ADN codificateur de protéines de myéline (MBP, MOG, PLP, MAG) dans l'EAE, et de l'association de cette vaccination avec l'administration d'ADN de cytokines Th2, ou d'oligonucléotides immunomodulateurs ; 2) identification et caractérisation de la réponse immune contre un nouveau component de la myéline avec un potentiel antigénique, la protéine inhibitrice du recroissement axonal, Nogo-A.

En ce qui concerne la vaccination avec de l'ADN, nos résultats prouvent l'efficacité de cette thérapeutique antigène-spécifique dans la prévention et le traitement de l'EAE. Leurs mécanismes d'action incluent, parmi autres, la suppression anergique de la prolifération antigène-spécifique des lymphocytes T anti-myéline, le biaisement Th2 de la réponse immune (quand co-administrée avec la vaccine de ADN codificatrice de la cytokine IL-4, fonctionnant comme une thérapie génique locale), et la réduction de la diversification des épitopes de la réponse humorale anti-myéline, évaluée à travers des *myelin spotted arrays*. L'association des vaccins d'ADN avec des oligonucléotides immunomodulateurs GpG, développés pour contrarier les séquences CpG immunostimulatrices présentes dans le vecteur de vaccination, mena à l'amélioration de son efficacité thérapeutique, du, probablement, à l'effet stimulateur préférentiel des oligonucléotides GpG sur les lymphocytes Th2 et sur les cellules régulatrices NK-T. Ayant pour base ces résultats, la vaccination avec de l'ADN fut développée pour le traitement de la SP humaine, des essais cliniques étant en cours dans ce moment.

En ce qui concerne la protéine Nogo-A, des études de structure primaire et de prévision d'antigénicité ont identifiées la région Nogo-66 comme une cible antigénique potentielle pour l'EAE. Dans les souris SJL/J et C57BL/6, nous fumes capable d'induire des signes cliniques et histologiques de EAE après immunisation avec les épitopes encéphalithogéniques Nogo1-22, Nogo23-44 et Nogo45-66, en utilisant des protocoles de défaillance de tolérance immune. En même temps, nous identifîâmes et caractérisâmes une réponse lymphocytaire T spécifique contre les antigènes contenus dans la région Nogo-66, et une réponse lymphocytaire B avec diversification intra et intermoléculaire à plusieurs déterminantes présentes dans d'autres protéines de la myéline. Le transfert adoptif de lignes cellulaires Th2 anti-Nogo45-66, apporta une amélioration clinique et histologique de l'EAE dans les animaux récipiends induits avec d'autres antigènes de myéline, après migration de ces cellules dans le SNC, et prouvent l'efficacité de thérapies antigène-spécifiques basées sur des antigènes existants dans la région Nogo-66.

Dans son ensemble, nos résultats confirment le potentiel thérapeutique des vaccinations d'ADN codificatrices de protéines de myéline, ainsi que l'importance des encéphalithogènes contenus dans la protéine Nogo-A pour la physiopathologie de l'EAE et de la SP, avec une relevance éventuelle pour le développement de nouvelles thérapies antigène-spécifiques. Le perfectionnement futur de ces thérapies pourra mener, éventuellement, à une capacité de manipulation de la réponse immune qui permette le traitement efficace des maladies inflammatoires démyélinisantes, comme la Sclérose en Plaques.

ZUSAMMENFASSUNG

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und wird hauptsächlich durch einen immun-vermittelten Angriff auf verschiedene Elemente der Myelinscheide verursacht. Unter den Antigen-Angriffszielen dieser auto-immunen Reaktion sind im Laufe der Jahre mehrere fetthaltige und Protein- Myelin-Komponente identifiziert worden, von denen sich vor allen Dingen, Myelinbasprotein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Proteolipid-Protein (PLP) und myelinassoziertes Glykoprotein (MAG) hervorheben. Durch die Entwicklung des Tiermodells der experimentellen auto-immunen Enzephalomyelitis (EAE) sind verschiedene antigenspezifische Therapien entworfen worden, basierend auf gutartigen Veränderungen, was die auto-immune Reaktion auf Myelin betrifft. Diese schließen die Verabreichung von Myelin, therapeutische Kopolymere, veränderte Peptide Ligande und seit kurzem die Schutzimpfung von Desoxiribonukleinsäure (DNA), die das Myelin-Protein kodifiziert.

Diese Arbeit soll die Ergebnisse einer großen Versuchssammlung vorstellen, die zwei wesentlichen Themen untergeordnet ist: 1) Bewertung des therapeutisches Potenzials und Aktionsmechanismen der Schutzimpfung mit myelin-protein-kodifiziertem DNA (MBP, MOG, PLP, MAG) in der EAE, und der Verabreichung dieser Schutzimpfung mit Th2-Zytokin-DNA zusammen, oder der immunomodulatorischen Oligonukleotide; 2) Bestimmung und Charakterisierung der Immunreaktion auf eine neue Myelinkomponente mit Antigen-Potenzial, das Protein, das axonale Nachwachsen, Nogo-A, hemmt.

Die DNA-Schutzimpfung betreffenden Ergebnisse beweisen die Wirksamkeit dieser antigen-spezifischen Therapie in der EAE-Vorsorge und -Behandlung. Die Wirkungsformen enthalten unter anderem eine anergische Unterdrückung der antigen-spezifischen Antimyeelin-T-Lymphzellenproliferation (in Präventionsform), die Th2-Abrichtung der Immunreaktion (wenn es mit Zytokin-IL-4-kodifizierter DNA-Schutzimpfung zusammen verabreicht wird, hat es die Wirkung einer lokalen Gentherapie) und die Verringerung der Epitop-Ausbreitung der Anti-Myelin-Antikörper-Reaktion, die durch *Myelin Spotted Arrays* bewertet wird. Die Verbindung der DNA-Schutzimpfungen mit GpG-Immunomodulator-Oligonukleotide, die zur Gegenwirkung von Immunostimulatoren-CpG-Sequenzen entwickelt und im Schutzimpfungsvektor vorhanden sind, führten zu einer therapeutischen Wirksamkeitsverbesserung, wahrscheinlich infolge des stimulierenden Vorzugseffekts der GpG-Oligonukleotide auf Th2-Lymphozyte und auf der regulierenden NK-T-Zellen. Auf diesen Ergebnissen basierend, wurde die DNA-Schutzimpfung zur MS-Behandlung bei Menschen entwickelt. Währenddessen, werden zur Zeit klinische Versuche durchgeführt.

Das Nogo-A-Protein betreffend, haben Elementarstruktur- und Antigen-Prognosestudien entdeckt, dass die Nogo-66 ein potenzielles Antigenangriffsziel für die EAE ist. In den SJL/J- und C57BL/6-Mäusestämmen ist es gelungen EAE-klinische und -histologische Anzeichen einzuleiten, und zwar nach der Immunisierung mit Encefalitogenepitopen Nogo1-22, Nogo23-44 und Nogo45-66, durch die Benutzung des Immuntoleranzunterbrechungstoleranzprotokolls. Gleichzeitig, haben wir eine spezifische T-Zellenreaktion auf diese Antigene identifiziert und charakterisiert, die sich in der Nogo66-Region befinden, so wie eine B-Zellenreaktion mit einer intra- und -intermolekularen Ausbreitung in verschiedenen Determinanten, die in anderen Myelin-Proteinen enthalten sind. Die adoptive Übertragung von Th2-Anti-Nogo45-66- Zellenlinien führte zu einer klinischen und histologischen Besserung der EAE im Falle von Empfangstieren, denen, nach der Zellenmigration zum ZNS, andere Antigenmyeline induziert wurden. Diese Angaben bestätigen die Bedeutung des Nogo-66 als Antigen der EAE, sowie die Wirksamkeit der antigenspezifischen Therapien, die auf dieser beruhen.

Abschließend bestätigen diese Ergebnisse das therapeutische Potenzial der myelin-protein-kodifizierenden DNA-Schutzimpfungen, sowie die Bedeutung der in den Nogo-A-Protein enthaltenen Encefalitogenen, für die Physiopathologie der EAE und der MS, die eventuell für die Weiterentwicklung neuer antigen-spezifischen Therapien relevant sein könnte. Die zukünftigen Studien und die Weiterbildung dieser Therapien können eventuell zu einer Manipulationsmöglichkeit der Immunreaktion führen, die eine erfolgreiche Behandlung der demyelinisierenden Entzündungskrankheiten, wie zum Beispiel die Multiple Sklerose, erreichen. Auf diesen Ergebnissen basierend, wurde die DNA-Schutzimpfung kann.

PRIMEIRA PARTE

CAPÍTULO I

Abordagem Clínica, Etiopatogénica, e Imunopatológica da Esclerose Múltipla e Doenças Desmielinizantes.

1. Introdução. A Esclerose Múltipla como doença desmielinizante primária. Epidemiologia, manifestações e subtipos clínicos. História natural da doença.

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória, desmielinizante, crónica, que afecta o Sistema Nervoso Central (SNC), caracterizando-se, habitualmente, pela ocorrência periódica e imprevisível de períodos de agravamento sintomático, consistindo de variadas combinações de sinais e sintomas neurológicos, que são comumente denominados de surtos. Na sua evolução, esta fase é seguida, mais tarde ou mais cedo, por um período de agravamento neurológico insidiosamente progressivo, que leva a um estado de grande incapacidade e dependência física e social. Presume-se, com base em várias evidências clínicas e experimentais, que seja causada, pelo menos em parte, por uma reacção autoimune dirigida contra a mielina do SNC, mediada por múltiplos mecanismos englobando quer a resposta imune inata quer a adquirida. Esta reacção imune é responsável por gerar o estigma histopatológico típico desta doença, i.e. a placa desmielinizante, dispersa por todo o SNC e centrada, normalmente, nos espaços perivenulares da substância branca profunda bi-hemisférica, no corpo caloso, nervo óptico, tronco cerebral e medula espinhal. As lesões desmielinizantes passam por uma fase aguda, marcadamente inflamatória, e, com o tempo, evoluem para cicatrizes gliais esclerosadas, disseminadas por várias regiões do SNC, das quais provém o nome desta doença. Mais recentemente, tem vindo a ser reconhecido que, a par desta faceta inflamatória mais exuberante, e mais facilmente detectável, existe um componente neurodegenerativo consistindo em perdas axonais progressivas e insidiosas, espalhadas um pouco por todo o SNC, e mesmo fora das regiões afectadas pela reacção inflamatória. Este fenómeno degenerativo, cuja causa é, ainda, pouco conhecida, provavelmente determina o prognóstico clínico a longo termo, e a sua progressão parece ser independente do processo autoimune. Como doença crónica e incurável, a EM é, reconhecidamente, a principal causa de incapacidade de origem

neurológica em adultos jovens, que resulta do acumular sequencial de défices neurológicos, com a correspondente perda de capacidades e graves consequências para o bem-estar físico, psíquico e social, tendo um impacto negativo considerável sobre a qualidade de vida dos doentes (1-6).

A doença afecta, provavelmente, entre 1 a 2 milhões de seres humanos à escala planetária, com 250 a 350 000 indivíduos nos Estados Unidos da América, e cerca de 400 000 na Europa (7-9). Estimativas de prevalência e incidência médias na Europa apontam para valores de 79/100 000 (intervalo de confiança de 95% entre 68 e 89, limites entre 17 e 154/100 000) e 4.2 casos/100 000/ano (intervalo de confiança de 95% entre 4.0-7.5, limites entre 0.7-6.9), respectivamente. Regionalmente, podem-se dividir os países europeus em 5 categorias de prevalência média: Malta (0-34/100 000); Chipre, Espanha, Estónia, França, Grécia, Hungria, Irlanda, Letónia, Lituânia, Polónia, Portugal (35-69/100 000); Alemanha, Áustria, Bélgica, Eslovénia, Holanda, Itália, Noruega, República Checa (70-104/100 000); Dinamarca, Islândia, Reino Unido, Suíça (105-139/100 000); Finlândia e Suécia (> 140/100 000) (7). Estes dados são baseados em estudos de prevalência nacional publicados ao longo dos últimos 20 anos; em Portugal, o único estudo de prevalência publicado na literatura internacional indexada é de João de Sá, que reportou uma taxa de prevalência de 46.3/100 000 para o distrito de Santarém em Novembro de 1998 (10). Naturalmente que estes dados de prevalência, bem como dados de incidência para o nosso País aguardam a realização de outros estudos mais abrangentes, de forma a poder ter-se uma ideia concreta do impacto epidemiológico da Esclerose Múltipla em Portugal. Estima-se, no entanto, com base neste único estudo, a existência, actualmente, de 5000 a 6000 doentes. De acordo com estes dados, e ao contrário do que até há pouco tempo era habitualmente considerado, segundo a classificação de KURTZKE, Portugal encontra-se entre as regiões de média-elevada prevalência de EM (11).

Do ponto de vista clínico, a Esclerose Múltipla caracteriza-se, como dissemos, pelo aparecimento de sinais e sintomas de disfunção neurológica atribuíveis a várias regiões do Sistema Nervoso Central, embora algumas

sejam mais tipicamente afectadas: nervo óptico, cerebelo, tronco cerebral, substância branca bi-hemisférica e medula espinhal (2, 3, 12). A doença surge, habitualmente, em adultos jovens (idade média entre os 20 e 40 anos), sobretudo em mulheres, com uma prevalência quase dupla em relação ao sexo masculino. As manifestações iniciais da doença consistem no aparecimento de um conjunto de sinais e sintomas de défice neurológico atribuíveis à lesão do SNC em uma ou mais localizações. As formas de apresentação mais comuns são nevrites ópticas mono-oculares, síndromes cerebelosas e do tronco cerebral e mielites transversas parciais (2, 3, 12). Embora por vezes, e, sobretudo, no início da doença, possam surgir sinais de disfunção neurológica unifocal (chamados actualmente de surtos monofocais, ou monossintomáticos), com muita frequência são encontrados indícios de disfunção neurológica resultantes da lesão de múltiplas áreas do SNC e de múltiplos sistemas funcionais, tais como o sistema piramidal, cerebelo, modalidades sensitivas e visão, e controle esfíncteriano urinário e fecal (12). Nem sempre é simples, no entanto, a correlação entre sinais e sintomas neurológicos e localizações no SNC; por exemplo, durante a preparação do ensaio clínico BENEFIT destinado ao tratamento precoce da EM (13), constatou-se uma grande disparidade de critérios nesta correlação, levando à necessidade de criação de um modelo de avaliação estandardizado (14). Existem, por vezes, sintomas paroxísticos estereotípicos, muito característicos da doença, tais como espasmos tónicos, dor ou parestesias paroxísticas (e.g., nevralgia do trigémeo); outro tipo de sintomas, igualmente muito típicos, é atribuível a perturbações da condução nervosa subclínicas, cuja manifestação é despoletada pelo calor, fadiga ou compressão. Entre estes estão os clássicos fenómenos de LHERMITTE e de UHTHOFF (2). Enquanto para todos estes sinais e sintomas é possível encontrar, normalmente, uma correlação clínico-anatómica, para outro tipo de sintomas e queixas neurológicas torna-se mais difícil encontrar uma focalização anatómica. Neste grupo englobam-se as queixas de fadiga (muito frequentes e incapacitantes), depressão e outras alterações comportamentais ou emocionais, e a deterioração cognitiva (reconhecida hoje em dia como muito

frequente, mesmo em fases precoces da doença) (12, 15). Em relação à fadiga, por exemplo, para além do óbvio papel dos défices neurológicos, e da consequente necessidade de utilização de maiores recursos energéticos e cognitivos para a realização de uma tarefa, tem sido reconhecido, progressivamente, o papel de alguns mediadores inflamatórios, tais como as citocinas pró-inflamatórias, na sua génese (16, 17). Por outro lado, foi também proposto um papel importante para os péptidos com capacidade de disrupção da condução nervosa, actuando através da sua interacção e bloqueio dos canais de sódio neuronais (tal como o pentapéptido endógeno Gln-Tyr-Asn-Ala-Asp - QYNAD), denominados genericamente “endocaínas” (dada a semelhança do seu mecanismo de acção com a lidocaína), e encontrados no líquido cefalorraquidiano de doentes com EM e síndrome de GUILLAIN-BARRÉ (18-20). No que respeita às alterações cognitivas e emocionais, é cada vez mais consensualmente aceite serem estes sintomas relacionados com uma disfunção generalizada da transmissão neuronal, provocada por perdas axonais progressivas e disseminadas encontradas em fases mais avançadas da doença. Na maioria dos doentes, após uma fase inicial em que ocorrem, periodicamente, surtos clínicos, com ou sem recuperação total após cada um, assiste-se ao estabelecimento insidioso de incapacidade neurológica correspondendo a uma disfunção medular progressiva, manifestada, sobretudo, por dificuldades de deambulação, levando à necessidade de recorrer a auxiliares da marcha (bengala, canadiana), bem como a frequentes problemas esfincterianos e sexuais (bexiga neurogênea, infecções urinárias de repetição, impotência sexual). Apesar de poderem ocorrer mais precocemente, é muitas vezes só nesta altura que são detectadas as perturbações cognitivas e comportamentais que acima referimos. Mais tarde, com o evoluir da doença, o doente fica num estado mais ou menos avançado de incapacidade neurológica e dependência, frequentemente limitado a cadeira de rodas ou acamado, vítima de múltiplas complicações médicas gerais, e sem autonomia para as actividades de vida diárias (2, 3, 12). A medição da incapacidade neurológica, sobretudo necessária para fins de estudos de história natural, e, também, para ensaios

clínicos, pode ser feita através de numerosas escalas, desenvolvidas ao longo dos anos. A mais frequentemente utilizada é a *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) de KURTZKE, que propõe uma avaliação objectiva dos défices neurológicos com base no exame de vários sistemas funcionais, e na capacidade para a marcha autónoma (21). São marcos fundamentais desta escala (de 0 – normal – até 10 – morte por EM), a passagem do EDSS 3 (separando os doentes com graus *minor* de défice neurológico, dos doentes com achados significativos no exame neurológico), EDSS 4.0 (incapacidade parcial para a marcha, mas sem necessidade de apoio), do EDSS 6.0 (necessidade constante de apoio unilateral), e EDSS 7.0 (confinamento a cadeira de rodas). Encontra-se muito para além do âmbito deste trabalho a caracterização pormenorizada das manifestações clínicas da Esclerose Múltipla, cuja descrição pode ser encontrada em vários trabalhos de síntese e em tratados dedicados a esta matéria, tais como o clássico *McAlpine's Multiple Sclerosis* cuja consulta é sempre útil, para esta e outras matérias deste capítulo.

Apesar do aparente pleomorfismo semiológico desta doença, as manifestações clínicas da EM podem, caracteristicamente, ser agrupadas em vários subgrupos de evolução, ou cursos clínicos, e que são conhecidos dos clínicos desde longa data. Uma tentativa de uniformizar a nomenclatura clínica utilizada para classificar os doentes foi feita por LUBLIN e REINGOLD em 1996, com base num inquérito internacional, e resultou no reconhecimento de quatro cursos clínicos fundamentais: EM com evolução por surtos e remissões (ou recidivante-remitente, EM-SR), EM primariamente progressiva (EM-PP), EM secundariamente progressiva (EM-SP), e EM progressiva com surtos (EM-PS) (22). Com algumas modificações pontuais e a inclusão de algumas outras categorias nosológicas, que adiante mencionaremos, são estes os termos mais comumente utilizados pela maioria dos clínicos e investigadores. Podemos dividir estas quatro categorias em duas unidades fundamentais; a maioria dos doentes (80%) manifesta-se inicialmente com formas de surto-remissão, e evolui na maioria dos casos para formas secundariamente progressivas, com 80% dos

doentes em formas progressivas ao fim de duas décadas (EM-SR e EM-SP) (23). Uma proporção de 10-20% dos doentes tem formas progressivas logo desde o início, em alguns casos com um ou outro surto ocasional (EM-PP e EM-PS) (24, 25). Dadas a evolução clínica, e o facto dos doentes com EM-PP serem uma população relativamente homogénea e com características diferentes da EM-SR, tem sido considerado que a EM-PP poderá corresponder, mais do que a um curso clínico diferente, a um subtipo etiopatogénico com características próprias.

Casos com manifestações inaugurais da doença, cada vez mais frequentes dada a maior capacidade de diagnóstico, em virtude sobretudo da divulgação das técnicas de imagem do SNC por Ressonância Magnética Nuclear, mas que ainda não cumprem os critérios de diagnóstico formais, são designados, habitualmente, de síndromes clínicas isoladas (SCI), que podem ser monofocais ou multifocais (26, 27). Esta não é, portanto, verdadeiramente uma categoria clínica, mas um conceito operacional: um SCI é, quase sempre, uma EM-SR que ainda não teve o seu segundo surto clínico, e que aguarda a formalização diagnóstica necessária. Mesmo do ponto de vista terapêutico, cada vez mais estes doentes são equiparados às formas surto-remissão, e é aconselhado o seu tratamento com medicamentos imunomoduladores, tais como o interferão beta (28). Outra categoria frequentemente mencionada é a Esclerose Múltipla benigna, reconhecida desde os trabalhos de MCALPINE no início da década de 60 (29), que poderá englobar até 20% dos doentes, e que se caracteriza pela ausência de incapacidade significativa, mesmo após uma longa evolução (23, 30, 31). Tal como a anterior, esta não é, igualmente, uma categoria clínica, mas, sim, prognóstica; os doentes com formas benignas são um subgrupo da EM-SR com lenta, ou nenhuma evolução, e um prognóstico favorável.

Dentro deste tema da história natural da doença, e como anteriormente referimos, na maioria dos doentes a uma fase inicial de evolução por surtos e remissão sucede-se a passagem à forma secundariamente progressiva (24, 32). A caracterização desta progressão foi feita extensivamente por vários autores, mas, sobretudo, a partir dos

trabalhos notáveis de Brian WEINSHENKER, no grupo de George EBERS (33-36). Tem sido motivo de debate recente na literatura o impacto que a fase inicial, com a ocorrência de surtos, tem no prognóstico e na progressão da doença. Seria de esperar, *a priori*, que a frequência e gravidade dos surtos tivesse um impacto significativo na progressão da doença, sobretudo para as formas clínicas mais agressivas e com lesões na medula espinhal (23), tal como a variante de DEVIC (37). No entanto, CONFAYREUX *et al.*, através da análise prospectiva de uma coorte numerosa de doentes (da base de registo europeia EDMUS (38)), estabeleceram o princípio de que a partir de uma fase de incapacidade intermédia, EDSS 4.0, a progressão é independente da taxa de surtos, e tem uma evolução semelhante para todos os doentes (39). Igualmente, os factores de prognóstico habitualmente apontados como importantes (idade, sexo, sintomas da apresentação, curso clínico, taxa de surtos nos primeiros 5 anos, recuperação após surto e tempo até ao segundo surto), só são válidos até atingir esta fronteira EDSS, e não parecem influenciar o curso clínico após o atingir deste nível de incapacidade – o chamado “processo amnésico”, como se após uma determinada fase da doença, o curso clínico anterior fosse “esquecido” e se tornasse irrelevante (40). Nas formas primariamente progressivas, a existência, ou não, de surtos, não parece, igualmente, ter qualquer impacto na evolução da incapacidade (41, 42), e o prognóstico a longo termo não é diferente entre as formas progressivas com surtos (EM-PS) e as formas secundariamente progressivas (43). Na mesma linha destes resultados, trabalhos recentes, publicados em 2006 pelo grupo de CONFAYREUX, mas também pelo de George EBERS, confirmaram a existência deste fenómeno, estudando vários subgrupos clínicos e comparando a sua evolução (44-46). Foi descoberto que, independentemente da forma inicial de evolução (surto único seguido de progressão, EM-SR seguida de progressão, ou EM-PP), após o início da fase progressiva, não existe qualquer diferença de curso clínico e que o grau de recuperação do primeiro surto não influencia a progressão da doença. Igualmente, as formas de EM-PP, ao contrário do habitualmente considerado, não têm pior prognóstico que as outras. Por

último, e de forma surpreendente, o tempo de início, ou de passagem à fase progressiva é independente do curso clínico, sendo, sempre, por volta dos 40 anos de idade (44).

A partir destes resultados, foi proposto por Christian CONFAVREUX um “conceito unificador” da doença, no qual os subgrupos clínicos acima descritos não correspondem, realmente, a formas diferentes da doença, com mecanismos etiopatogénicos diferentes, mas, sim, a diferentes formas de evolução separadas no tempo, i.e., que o curso e fenótipo clínico da Esclerose Múltipla é, fundamentalmente, dependente do tempo (Figura 1). Na EM-SR não haveria, ainda, tempo suficiente para a progressão se manifestar clinicamente; a EM-SP seria uma EM-SR que tivesse tempo de “envelhecer”, e a EM-PP/EM-PS a forma “amputada” do seu início por surtos (45). Dito de outra forma, o aparecimento da fase progressiva é um fenómeno independente do curso clínico inicial, e dependente da idade: a EM comporta-se, assim, como uma doença neurodegenerativa insidiosa, de início na idade jovem, e que se manifesta a partir dos 40 anos, de forma provavelmente relacionada com a patologia subjacente, como uma mielopatia progressiva associada a um quadro demencial. A existência de surtos, previamente a esta fase, é o fenótipo mais frequente, mas não necessário; os surtos determinam a incapacidade a curto prazo, e são a manifestação clínica mais exuberante durante esta fase do curso clínico, mas, provavelmente, não influenciam o processo neurodegenerativo subjacente (45). Estes autores propuseram, assim, uma reclassificação da história natural da doença, em que a EM seria dividida em duas formas de apresentação (surtos-remissão e progressiva) e três formas de evolução (surtos-remissão, secundariamente progressiva, primariamente progressiva), resultando em cinco fenótipos clínicos baseados na existência, ou não, de fase com surtos antes da fase progressiva (45).

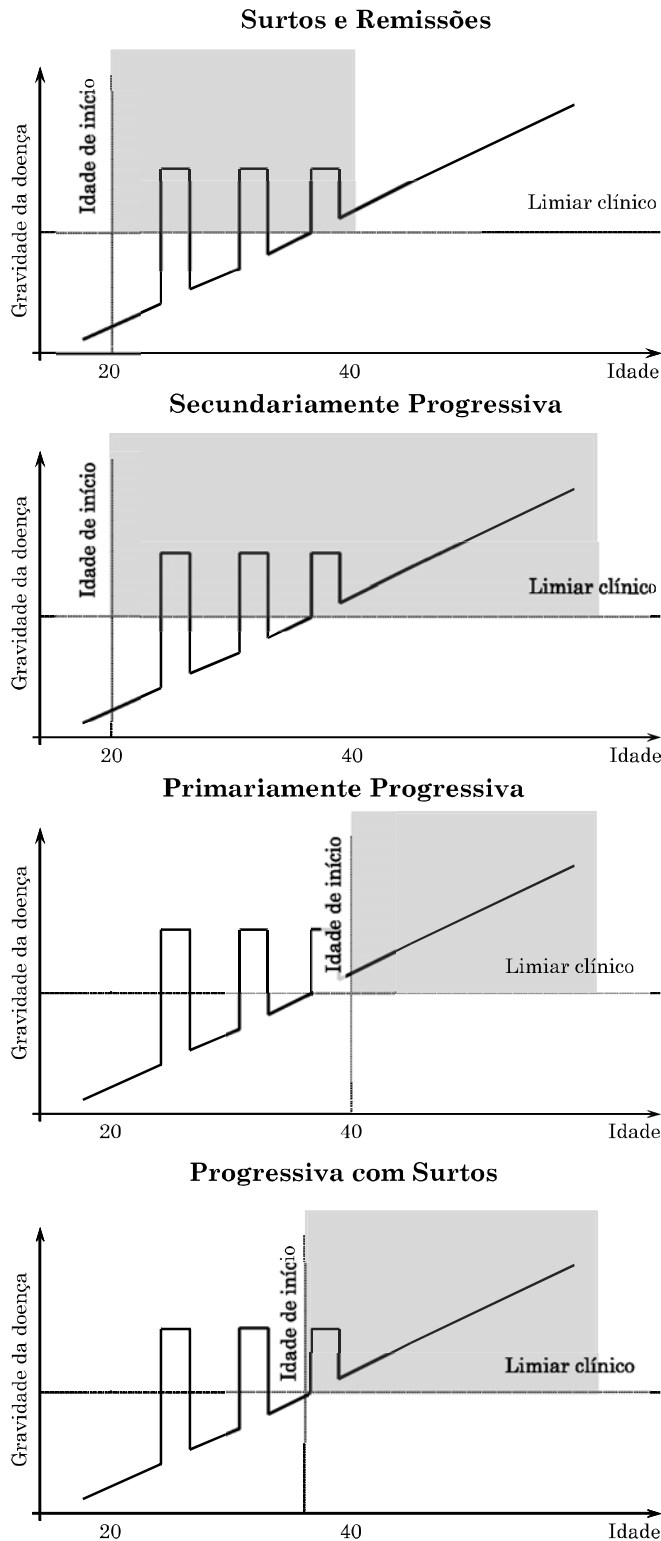


Figura 1 – História natural da Esclerose Múltipla (EM).

Com base nos modelos de progressão da doença propostos por CONFAVREUX *et al.*, elaborámos quatro diagramas representando os cursos clínicos mais frequentes, tais como foram propostos por LUBLIN e REINGOLD. Assinalada no eixo das abcissas está a idade do doente, e no eixo das ordenadas a gravidade da doença, conforme medida por alguma das escalas habitualmente empregues (e.g. EDSS). Encontram-se assinaladas a tracejado duas linhas representando, respectivamente, a idade de início dos sintomas e o limiar de manifestação clínica, i.e., o limiar a partir do qual as alterações fisiopatológicas subjacentes são suficientemente severas para produzir sinais ou sintomas de disfunção neurológica. A cinzento, assinalámos a zona correspondente a cada um dos cursos clínicos. A EM evoluindo por surtos e remissões, e secundariamente progressiva são apenas fases diferentes do mesmo curso clínico, com a mesma idade de aparecimento (2ª ou 3ª década). A EM primariamente progressiva, e progressiva com surtos, são manifestações do mesmo processo patológico, apenas com início mais tardio e que, portanto, não teve (ou apenas brevemente teve) a sua fase de surtos inicial.

2. Diagnóstico, critérios de diagnóstico, biomarcadores e diagnóstico diferencial. Heterogeneidade clínica e geográfica: o espectro das doenças desmielinizantes primárias.

A Esclerose Múltipla é habitualmente classificada dentro da diversidade das patologias neurológicas, no grupo das doenças desmielinizantes adquiridas, ou seja, nas quais, após um período de normal desenvolvimento do Sistema Nervoso com regular mielinização axonal, ocorre – no contexto de variadas etiologias – uma perda de mielina. Considera-se, assim, que o alvo primário desta doença é a mielina do SNC, e que a sua perda é o substrato patológico principal e determinante das manifestações clínicas. Tal como anteriormente alegámos, e adiante explanaremos em maior pormenor, esta visão, sendo verdadeira, é demasiado simplificadora. Uma vez que na EM a desmielinização não se dá em consequência de alguma agressão externa ao organismo, mas, sim, motivada por uma reacção inflamatória com características provavelmente autoimunes, esta e algumas outras doenças desmielinizantes são denominadas de primárias (por oposição às outras, secundárias). Ao longo dos anos têm sido agregadas a esta categoria numerosas outras doenças, algumas que serão, provavelmente, apenas subtipos clínicos da EM, enquanto outras correspondem a entidades nosológicas independentes, e com mecanismos etiopatogénicos próprios.

O diagnóstico da Esclerose Múltipla é feito com base num conjunto de dados clínicos e paraclínicos, entre os quais assumem particular relevância a imagem por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do neuro-eixo, e o exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) (47, 48). Caracteristicamente, a história e o exame físico revelam, e confirmam, evidências de lesão neurológica multifocal afectando vários sistemas neurológicos, cujo aparecimento é, normalmente, disperso ao longo de vários meses ou anos (12). A RMN do neuro-eixo confirma a existência de lesões afectando, predominantemente, a substância branca dos hemisférios cerebrais, cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (49, 50). Estas lesões, pelas

características imagiológicas evidenciadas nas várias sequências RMN habitualmente utilizadas, podem ser classificadas quanto à sua antiguidade e grau de lesão parenquimatosa subjacente. A sua localização permite, na maioria dos casos, uma boa correlação clínico-anatómica com os sinais e sintomas apresentados pelos doentes. Nas lesões recentes, é habitualmente encontrada uma disrupção da barreira hemato-encefálica, evidenciada através do uso de contrastes paramagnéticos baseados em compostos de gadolínio, que se pensa estar relacionada com uma reacção inflamatória local (49). Técnicas mais recentes permitem uma caracterização muito mais precisa do impacto da Esclerose Múltipla no SNC, e uma correlação não só com os sinais clínicos de disfunção focal durante os surtos, mas, também, com a progressão da incapacidade neurológica nas fases mais tardias da doença (49, 50). Entre estas, mencionamos, brevemente, a análise volumétrica da carga lesional e atrofia cerebral, a espectroscopia protónica ^1H para detecção de sinais metabólicos de disfunção neuronal, a RMN funcional, imagens por transferência de magnetização permitindo a avaliação da substância branca de aparência normal (SBAN), imagens de tensão-difusão para avaliação da microestrutura parenquimatosa e tractografia das vias longas, e RMN de campo magnético de alta potência (acima de 3.0 Tesla).

O exame do líquido cefalorraquidiano obtido nestes doentes permite obter evidência indirecta da activação do Sistema Imune (SI), que se presume estar subjacente à etiopatogénese da EM, e constitui um dos pilares fundamentais no diagnóstico nas várias fases desta doença (51, 52). Critérios de consenso para a análise do LCR na EM foram publicados recentemente, abrangendo as várias técnicas empregues e propondo um conjunto de critérios de qualidade (53). De entre os vários parâmetros que é possível avaliar, a detecção do aumento oligoclonal de imunoglobulinas no LCR através de métodos imunoquímicos e electroforéticos, iniciada por Elvin KABAT a partir de 1942 foi, historicamente, uma das primeiras demonstrações do papel do Sistema Imune na EM, e, também, um dos primeiros testes diagnósticos desenvolvidos (54-56). Actualmente, a detecção

da oligoclonalidade das imunoglobulinas presentes no LCR destes doentes é feita por imuno-electroforese das proteínas com focagem isoeléctrica, com detecção de bandas oligoclonais feita por vários métodos; com este método em mais de 95% dos doentes com Esclerose Múltipla (52). Na população portuguesa, Maria José SÁ *et al.*, confirmaram uma prevalência de 82% nesta população, com uma sensibilidade e especificidade de 82 e 80%, respectivamente, para o diagnóstico de EM (57). Por último são, por vezes, empregues testes neurofisiológicos, tal como os potenciais evocados sensitivos-sensoriais (visuais, auditivos, sensitivos), para detecção de lesão subclínica em várias localizações do SNC. Embora fossem, inicialmente, realizados potenciais evocados somato-sensitivos (úteis sobretudo para detecção de lesões medulares) e auditivos (para detecção de lesão do tronco cerebral), a grande evolução das técnicas de imagem levou a que, hoje em dia, sejam praticamente utilizados apenas os potenciais evocados visuais, que permitem estudar a região pré e pós-quiasmática do nervo óptico (58-60). Este tipo de estudo poderá ter, também, para além do seu papel no diagnóstico, alguma importância para avaliação da progressão da doença (59, 61).

Pretende-se, com as investigações clínicas e paraclínicas acima citadas, obter evidência da existência de lesões disseminadas em várias localizações do SNC, e a confirmação de um curso clínico típico, com recorrência de ataques ao longo do tempo – ou, mais simplesmente, disseminação de lesões no espaço e no tempo (47, 48, 62). Naturalmente que, como se pode depreender, para as formas primariamente progressivas, torna-se mais difícil estabelecer um diagnóstico, dada a evolução clínica não se processar por surtos. Mesmo para as formas mais típicas de surto-remissão, existe uma percentagem de erro de diagnóstico entre 5 a 10% (63). Com a disseminação do uso da RMN para diagnóstico em doentes com queixas neurológicas, tem-se, igualmente, verificado um aumento de casos falsos-positivos, em virtude da inespecificidade da RMN para esta doença. Por exemplo, numa casuística recente proveniente de um centro universitário, somente em 33% dos casos referenciados com a hipótese de

EM, ou EM-provável (sobretudo com base em exames RMN prévios), este diagnóstico foi confirmado, sendo que os restantes casos tinham outras doenças neurológicas (31.5%), doença psiquiátrica (22.5%) ou ficaram sem diagnóstico (12.5%) (64). Nos doentes referenciados por alterações na RMN, e que não tinham EM, a maioria correspondia a enxaqueca (37%) ou a alterações inespecíficas (22%) (64). Na ausência de um teste diagnóstico específico, e com a necessidade de confirmação diagnóstica cada vez mais presente, dadas as implicações pessoais, sociais e médicas que o diagnóstico de EM acarreta, houve a necessidade de criar critérios de diagnóstico relativamente específicos para esta doença. Por outro lado, a partir do momento em que se começaram a realizar ensaios terapêuticos de forma regular, os critérios de diagnóstico permitiram garantir a homogeneidade da população a ser testada. Actualmente, dado o consenso cada vez mais alargado da necessidade de terapêutica precoce, a confirmação diagnóstica é um passo fundamental para o acesso às terapias modificadoras de doença.

Não existindo manifestações clínicas patognomónicas desta doença, e dada a inespecificidade das alterações encontradas na RMN do neuro-eixo, têm-se desenvolvido esforços para encontrar um teste laboratorial diagnóstico, que pudesse inequivocamente confirmar, ou negar, a presença de EM. Dentro deste campo, o desenvolvimento de biomarcadores (marcadores biológicos) tem suscitado grande interesse; um biomarcador pode ser um gene, proteína, ou outra molécula biológica que reflecte processos fisiológicos ou fisiopatológicos subjacentes a uma doença. O marcador biológico ideal reflecte, directamente, a fisiopatologia, encontra-se num órgão ou fluido biológico facilmente acessível, é quantificável de forma rápida, e contribui para o diagnóstico e prognóstico da doença. Duas estratégias de investigação de biomarcadores têm sido empregues: investigação baseada em hipóteses e investigação baseada em descobertas (*hypothesis-driven research*, e *discovery-driven research*) (65). Na primeira, são testados alvos-candidatos escolhidos com base na nossa compreensão actual da doença, enquanto que, na segunda, são empregues estratégias de avaliação em massa (*mass screening*) que, não partindo de hipóteses

fisiopatológicas *a priori*, pretendem avaliar, de forma abrangente, as alterações metabólicas num determinado órgão-alvo.

Um exemplo do primeiro tipo de estratégia, e que está actualmente em uso, é a detecção de bandas oligoclonais, como acima mencionámos (52, 66). A isotipagem destas bandas, sobretudo para a detecção de IgM, tem sido apontada, recentemente, como um bom marcador de prognóstico para a EM, uma técnica desenvolvida pelo grupo de ALVAREZ-CERMEÑO (67, 68). Por outro lado, o esclarecimento dos alvos antigénicos desta reacção imune humoral poderá, igualmente, ser importante. BERGER *et al.*, num muito citado estudo, publicado em 2003, chamou a atenção para a importância da presença de anticorpos anti-proteína básica de mielina (MBP) e proteína oligodendrocitária da mielina (MOG), como factor de prognóstico para a conversão de SCI em EM definitiva (69). Estes resultados têm sido dificilmente reproduzíveis por outros grupos, sobretudo pela grande diversidade de técnicas empregues para a sua detecção. Não é claro, ainda, qual o papel que a detecção destes anticorpos poderá assumir no futuro; eventualmente, os anticorpos anti-MOG poderão ser marcadores mais específicos do processo inflamatório na EM (70-75). Mais recentemente, a detecção de anticorpos anti-lipídicos, nomeadamente correspondendo às bandas oligoclonais IgM anteriormente mencionadas, foi apontada como um factor prognóstico determinante para esta doença (76). Outros biomarcadores potencialmente interessantes têm sido desenvolvidos com base no conceito da EM como doença inflamatória/imuno-mediada; entre estes, destacamos as citocinas (TNF, IL-1 β , IFN γ , IL-2, IL-6, IL-12), quimiocinas (CCL5, CXCL10, CCL2), moléculas de adesão celular (s-ICAM1, VCAM-1), metaloproteinases de matriz (MMP-2, 3, 7, 9), óxido nítrico e superóxido, a substância “MBP-like” urinária (MBPLM) e marcadores de apoptose (survivina). Outros marcadores pretendem medir o grau de destruição axonal, tais como as proteínas do citosqueleto (subunidade leve dos neurofilamento, actina, tubulina, tau), marcadores de lesão da membrana celular (24S-hidroxicoesterol, apolipoproteína E), e vários outros

(proteína 14-3-3, proteína precursora do amiloide, N-acetil aspartato, enolase específica de neurónio) (77-80).

O segundo tipo de abordagem (*mass screening*) baseia-se nas recentemente desenvolvidas tecnologias de análise genómica e proteómica, e que permitem avaliar, simultaneamente, a expressão genómica de um tecido ou órgão-alvo (i.e. detecção de todos os genes a serem expressos, e sua quantificação), ou o seu conteúdo proteómico (i.e. todas as proteínas presentes) (65, 81). A análise genómica tem sido feita sobretudo com base nas tecnologias dos *spotted arrays* e dos *oligonucleotide arrays* que detectam o ARN mensageiro por processos de hibridização com cADN e detecção por fluorescência (82). Com base nesta tecnologia, tem sido possível encontrar padrões de expressão genómica relativamente específicos para a EM, e que permitem, inclusivamente, a sua distinção de outras doenças autoimunes (83-85). Os estudos de análise proteómica baseiam-se, primariamente, na tecnologia de electroforese bidimensional (2DE), associada, de seguida, à detecção e caracterização de proteínas individuais por métodos de espectroscopia de massa, nomeadamente através da técnica MALDI/TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*) (86). Com base nesta tecnologia, é possível estudar pormenorizadamente o proteoma presente no líquido cefalorraquidiano, e compará-lo entre doentes e controlos. Só muito recentemente os primeiros trabalhos deste tipo principiaram a ser realizados, tendo sido possível começar a caracterizar o proteoma do LCR normal (87), e de doentes com Esclerose Múltipla (88). A partir da análise proteómica do soro destes doentes, foi possível, também, identificar novos alvos antigénicos potenciais (89) e, inclusivamente, postular a existência de uma assinatura molecular específica da EM, e propor 3 biomarcadores específicos, cuja confirmação é ainda aguardada (90).

Dentro do mesmo grupo nosológico das doenças desmielinizantes primárias, várias entidades clínicas podem ser consideradas para além da EM. Estas incluem não só as variantes de evolução clínica anteriormente mencionadas, tais como os síndromes clínicos isolados, ou as formas

primariamente progressivas (medulares, cerebelosas, etc.), mas, também, outras entidades mais raras e cuja relação com a EM é presumida com base na semelhança de achados clínicos e laboratoriais, e, ainda, na evolução de umas para as outras. De entre estas outras entidades, destacamos as formas monofásicas, habitualmente pós-infecciosas, como as mielites transversas e a encefalomielite aguda disseminada (EMAD), e, igualmente, as variantes de localização anatómica restrita, como as doenças de DEVIC ou de BALÓ, ou de maior severidade, como a variante de MARBURG (Figura 2) (91, 92).

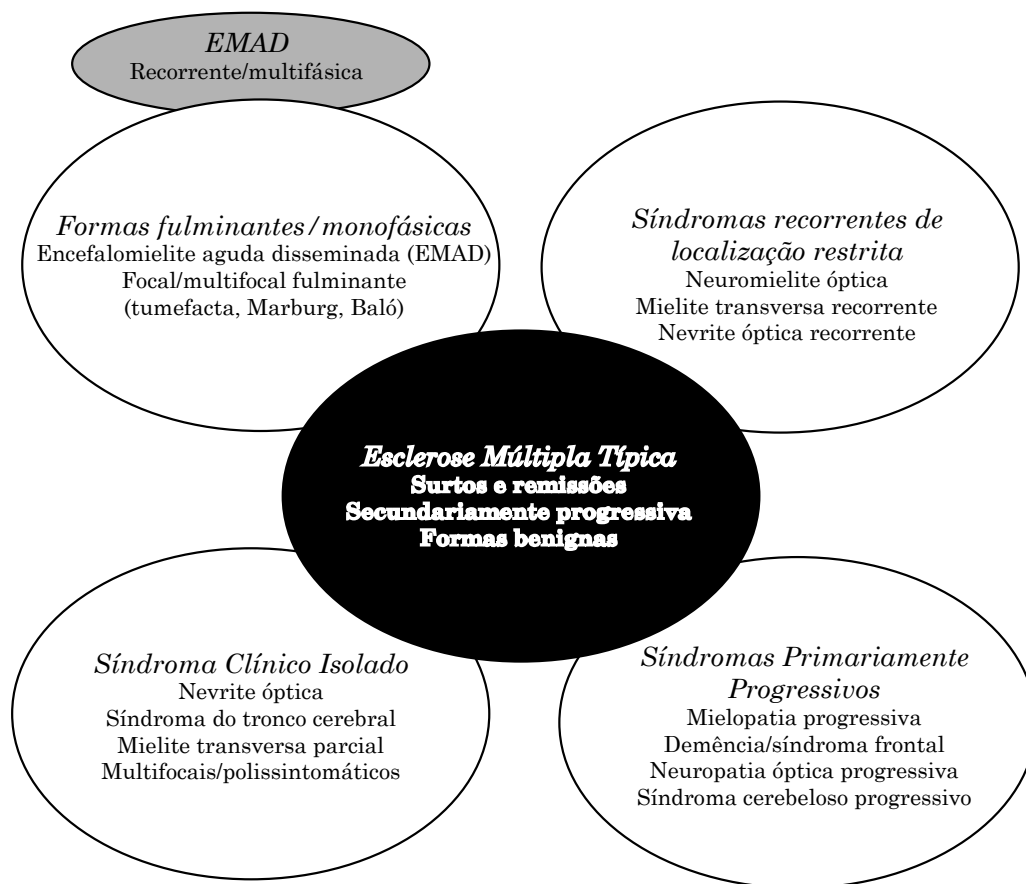


Figura 2. Espectro das doenças desmielinizantes inflamatórias idiopáticas. Adaptado e modificado de Weinshenker BG *Diagnosis: to McDonald and beyond*, American Academy of Neurology 2006.

A variante de MARBURG (descrita em 1906) é uma forma particularmente agressiva de apresentação de EM, com lesões extensas da substância branca, habitualmente monofásica e de progressão rápida até à morte (93). Existem poucos casos bem documentados na literatura, e não está, ainda, claro se esta apresentação corresponde, apenas, ao extremo do espectro de gravidade da EM, ou se existem mecanismos fisiopatológicos próprios; pelo menos num trabalho, foi sugerido que esta variante estaria associada à existência de formas imaturas, citrulinadas e mal fosforiladas, da proteína básica da mielina (94). A esclerose concêntrica de BALÓ (descrita em 1927) é igualmente muito agressiva, com um curso monofásico agudo, e as lesões apresentam um padrão peculiar de desmielinização concêntrica com anéis desmielinizados alternando com anéis mielinizados (93). Recentemente, foi sustentado que estas alterações patológicas correspondem à existência de um pré-condicionamento do parênquima cerebral à hipoxia, em virtude da detecção da expressão do factor indutível pela hipoxia (HIF-1 α) e da proteína de choque térmico hsp70 na orla destas lesões (95). Presume-se que exista um estímulo hipoxico (e.g., tóxico mitocondrial, etc.) que estimule a síntese destas moléculas na orla da lesão desmielinizante focal, como forma de protecção; à medida que o tempo passa, sucedem-se ondas de desmielinização, que não podendo afectar o tecido pré-condicionado, lesionam a substância branca para além dele, e induzem nova orla de protecção, dando origem ao padrão típico desta variante (95). Por último, a doença de DEVIC, ou neuromielite óptica (NMO, descrita em 1894 por DEVIC e GAULT, e anteriormente mencionada por ALBUTT em 1870 (96, 97)) é uma combinação de nevrite óptica uni ou bilateral, e mielite extensa, com curso monofásico ou recorrente, e que leva rapidamente a grande incapacidade. Critérios de diagnóstico para esta entidade foram propostos por Dean WINGERCHUCK *et al.*, e recentemente modificados para incluir um marcador biológico específico, um anticorpo anti-aquaporina-4, denominado IgG-NMO, e permitindo a existência de lesões desmielinizantes noutras zonas do SNC (37, 98). A descoberta deste biomarcador específico – o primeiro exemplo no que respeita às doenças

desmielinizantes – permite, tal como anteriormente referimos, um diagnóstico preciso, e abre a possibilidade de reclassificação de uma série de outras entidades semelhantes dentro do mesmo grupo; assim, algumas formas de mielite transversa recorrente, ou de nevrite óptica recorrente, poderão, dessa maneira, passar a pertencer ao espectro clínico da NMO (91).

A EMAD é uma doença desmielinizante, monofásica, do SNC, que afecta, predominantemente, crianças e adolescentes, com uma incidência anual cerca de 0.8/100 000 (99). Existem poucas séries de doentes publicadas com estudo prospectivo prolongado, mas nas mais recentes tem-se confirmado que até 35% dos doentes adultos com EMAD evoluem nos 3 anos seguintes para EM clinicamente definitivas (100, 101). Nos jovens e crianças, embora não existam critérios específicos para distinguir a EMAD da EM de início precoce (*early onset Multiple Sclerosis*, formas com início antes dos 16 anos (102, 103)), a ausência de bandas oligoclonais no LCR, carga lesional elevada na RMN, envolvimento da substância cinzenta, e ataxia de início precoce têm sido apontados como a favor da EMAD (104, 105). Em mais de metade dos casos, a EMAD ocorre na sequência de uma infecção viral (Coronavírus, Coxsackievírus, vírus EPSTEIN-BARR, Herpesvírus, etc.) ou bacteriana (e.g. *Chlamydia* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*), sobretudo do tracto respiratório superior, ou, então, de vacinações (hepatite B, sarampo, papeira, tosse convulsa, raiva, rubéola) (99, 106). Tipicamente, 1 ou 2 semanas após estes eventos provocadores, surgem sintomas neurológicos de forma aguda/subaguda, tais como alterações da vigília, sinais focais (parésias, hemianopsia, ataxia, síndromes do tronco cerebral, etc.) e cefaleias (99, 106). O exame imagiológico do neuro-eixo revela a presença de múltiplas lesões desmielinizantes, disseminadas, por vezes confluentes, em idêntica fase de evolução (99). Apesar de não haver critérios de diferenciação por RMN entre a EM e a EMAD, a presença de lesões periventriculares, ou de lesões perpendiculares ao corpo caloso (“dedos de DAWSON”) é considerada como mais típica, e conferindo maior risco de conversão em EM (107).

Em alguns casos, a apresentação clínica é mais limitada anatomicamente, e consiste, apenas, numa mielite transversa pós-infecciosa, ou numa nevrite óptica uni ou bilateral (99); noutros, o quadro clínico torna-se rapidamente muito mais severo, e surgem, para além dos anteriores, sinais de hipertensão intracraniana. O extremo mais maligno deste espectro é a leucoencefalite hemorrágica de WESTON HURST (108, 109), na qual há extensas lesões necrotizantes e hemorrágicas sobrepostas às lesões desmielinizantes habituais, e que é, normalmente, fatal, como num caso que publicámos há alguns anos (109, 110). Outras formas igualmente graves de EMAD, ocorrendo até 31% dos casos na criança, apresentam-se como lesões cerebrais extensas, com efeito de massa, com semelhanças com a esclerose mielinoclástica difusa de SCHILDER (92, 104); noutros casos, surgem lesões talâmicas bilaterais simétricas, necrotizantes, ocorrendo em cerca de 10% dos casos, sendo então empregue a denominação de encefalopatia necrotizante aguda da infância (104, 111). Aumentando ainda mais a heterogeneidade desta entidade, têm sido descritas formas multifásicas ou recorrentes, nas quais a distinção com a EM é ainda mais difícil (112). Nestas formas de encefalomielite disseminada multifásica (EMDM), que ocorrem em cerca de 15% dos casos pediátricos (113), surgem sinais de agravamento neurológico durante a cessação de terapêutica, ou nos dois meses imediatos, tendo sido proposto que após este período, qualquer novo surto deva ser considerado diagnóstico de EM (99).

Para além destas variantes clínicas, devem ser também, brevemente, mencionadas as variantes geográficas da EM. Uma vez que esta doença foi descrita em doentes caucasianos, e a sua maior prevalência seja, ainda, entre estas populações (particularmente as de ascendência nórdica), é natural a existência de um viés considerável no que diz respeito ao conhecimento de outras formas de doença desmielinizante em outras populações. Para dar apenas dois exemplos, no Japão existe uma elevada frequência de formas óptico-espinhais de EM, e que, recentemente, pela descoberta acima mencionada do anticorpo IgG-NMO, se descobriu corresponderem, provavelmente, a neuromielites ópticas de DEVIC (114-

117). Embora a prevalência de doenças desmielinizantes na África subsaariana seja muito menor que nos outros continentes, nas poucas séries descritas recentemente tem sido notada, igualmente, uma relativa preponderância de casos com afecção do nervo óptico e medula espinhal, à semelhança da NMO (118). Na base destas variantes geográficas da EM estarão, muito provavelmente, diferenças nos condicionantes genéticos associados a esta doença (que adiante discutiremos), e, possivelmente, também nos seus factores despoletantes, tais como os agentes infecciosos. Recentemente, baseado neste e em vários outros estudos geográficos, bem como na análise de haplotipos mitocondriais e genética populacional, Alastair COMPSTON propôs que as formas óptico-espinhais, mais prevalentes em populações não-caucasianas, correspondam a uma “proto”-EM, na qual os mecanismos patogénicos se baseiam, sobretudo, numa resposta imune *Thelper2* (Th2); a EM típica caucasiana (surto-remissão) seria uma “neo”-EM mediada, predominantemente, por uma resposta Th1 e na qual o contributo das infecções despoletantes (sobretudo do vírus EPSTEIN-BARR - EBV) seria mais importante (119). O aparecimento, e predomínio desta “neo”-EM, na população europeia, teria como causa a modificação do repertório genético nesta zona do globo, durante o repovoamento ocorrido após a última Idade do Gelo, a partir de uma migração fundadora provinda da Anatólia (período neolítico, 10 000 anos a.C.). Este efeito fundador associou-se, depois, ao filtro imuno-genético de um ecossistema rico em agentes microbianos patogénicos (com vários períodos de epidemia catastrófica). Estes factores levaram a um progressivo enviesamento dos genes de resposta imune no sentido de uma prevalência de respostas imune Th1 e de memória, com o consequente risco acrescido de autoimunidade. Mais tarde, a partir do século XIX, esta “bomba-relógio genética” (assim denominada por COMPSTON (119)) foi despoletada pelo contacto tardio, durante a adolescência ou idade adulta jovem com agentes infecciosos, e.g., EBV, fruto das modificações culturais e sociais da era industrial, levando ao aparecimento do fenótipo de surto-remissão disseminado. Enquanto que na era pré-industrial, o contacto com estes agentes ocorria durante a infância, a

melhoria das condições de vida e de higiene, e o aumento da densidade populacional nas cidades, atrasou, cada vez mais, o contacto do Sistema Imune com estes agentes. No resto do globo, com a ausência destas modificações genéticas e civilizacionais, continuou a prevalecer a forma “original” da doença, associada uma resposta Th2 geradora do fenótipo da neuromielite óptica, e só mais recentemente começaram a aumentar as formas de “neo”-EM (119, 120).

Ao longo dos anos vários critérios de diagnóstico para a EM têm sido propostos, tal como revisto recentemente por POSER e BRINAR (121). Embora CHARCOT, em 1868, já tivesse proposto a existência de uma tríade de manifestações clínicas, consistindo em nistagmo, tremor intencional e voz escandida, e MARBURG, em 1906 tivesse salientado a combinação de palidez do disco óptico, ausência de reflexos abdominais (o sinal de PIERRE MARIE) e sinais piramidais como típicos da EM, somente em 1954 ALLISON e MILLER propuseram o primeiro esquema diagnóstico, separando os casos em precoces, prováveis e possíveis (122). O estabelecimento de critérios de diagnóstico para a participação em ensaios clínicos, por parte de um painel do *National Institute of Neurological Diseases and Blindness*, encabeçado por George SCHUMACHER, foi, sem dúvida, um dos principais marcos no diagnóstico desta doença. Os critérios de SCHUMACHER (como ficaram conhecidos) tornaram-se, rapidamente, no “gold standard” do diagnóstico, e foram os primeiros a formalizar a necessidade de provar a disseminação das lesões no espaço e no tempo, a idade típica de aparecimento dos sintomas, e a necessidade de um diagnóstico clínico cuidadoso e da ausência de outra explicação para a sintomatologia (123). Segundo estes critérios, a EM é diagnosticada em indivíduos de 10 a 50 anos que possuam sinais objectivos de disfunção do SNC, com evidência de lesão em 2 ou mais localizações, atribuíveis à substância branca, com dois ou mais episódios de disfunção neurológica com duração de mais de 24 horas e separados por um intervalo de pelo menos 6 meses, ou tendo progressão clínica durante pelo menos 6 meses, e nos quais outras causas prováveis de doença neurológica tenham sido excluídas (123).

Embora outros critérios tivessem sido propostos, nos anos subsequentes, por MCALPINE, LUMSDEN e ACHESON, ROSE, MCDONALD e HALLIDAY, KUROIWA, e BAUER (revistos em (121)), só em 1983 se modificaram, significativamente, os critérios anteriores. A evolução das técnicas de estudo paraclínico (potenciais evocados e estudos do LCR), mas, sobretudo, a revolução da neuroimagem, levou à necessidade da sua integração num processo diagnóstico que se queria cada vez mais preciso. Para esse fim, um painel de neurologistas anglo-saxónicos (EUA, Canadá e Reino Unido), liderado por Charles POSER, estabeleceu novos critérios de diagnóstico, que, mantendo o dogma da disseminação no tempo e espaço, permitia o aporte dos exames complementares para sua prova, e dessa forma estabelecia categorias de diagnóstico baseadas na clínica ou com apoio de técnicas de laboratório, tais como o estudo do LCR (“laboratory-supported”) (124). O máximo da certeza diagnóstica (EM clinicamente definitiva) correspondia, no fundo, aos critérios de SCHUMACHER de confirmação clínica do curso habitual da doença; tornou-se possível, no entanto, a confirmação do diagnóstico em casos com menor certeza clínica, na presença de alterações típicas do LCR (EM definitiva com apoio laboratorial). A última grande modificação dos critérios de diagnóstico sucedeu em 2001 (com uma revisão posterior em 2005), fruto do trabalho de um painel internacional de peritos em EM, sob a coordenação do Professor Ian MCDONALD (125, 126). Estes novos critérios, actualmente empregues pela maioria dos centros clínicos, assinalam duas mudanças fundamentais: a necessidade de um diagnóstico cada vez mais precoce, de forma a iniciar terapêutica adequada, e a primazia da RMN como método não-clínico de avaliar a actividade e progressão da doença. Foram criados, pela primeira vez, critérios de avaliação das alterações encontradas na RMN (com base nos estudos de Frederic BARKHOFF), e propostos critérios diagnósticos para a EM primariamente progressiva (125, 126). Apesar de tudo, e no essencial, estes novos critérios continuam a manter um conceito etiopatogénico subjacente semelhante, i.e., a EM é uma doença da substância branca do SNC, de causa inflamatória ou imuno-mediada, que evolui por surtos e

remissões. A prova da existência de lesões neurológicas já não é dada somente pela semiologia, uma vez que a RMN tem uma sensibilidade de detecção muito maior, e permite a sua localização precisa; a confirmação do papel do Sistema Imune é feita pela detecção da expansão oligoclonal dos linfócitos B, através da sua produção de imunoglobulinas. Eliminaram-se as diferenciações entre diagnósticos por dados clínicos ou laboratoriais e reduziram-se as categorias diagnósticas a apenas 3: EM, não-EM e EM possível (125). Tem sido apontado, por alguns autores, que estes critérios são úteis sobretudo como identificadores de prognóstico na passagem de SCI para EM definitiva, e não, verdadeiramente, como diagnósticos (121).

Apesar da sua utilidade inegável, e da sua aplicação ter facilitado e harmonizado o processo diagnóstico da EM, quaisquer destes critérios de diagnóstico, tem limitações importantes. Os critérios de diagnóstico “ideais” deveriam ser fáceis de utilizar (o que não é verdade, particularmente para os critérios de POSER, e para os critérios de BARKHOFF para RMN, incluídos nos critérios de MCDONALD), teriam elevada sensibilidade e especificidade, permitiriam a detecção precoce e inequívoca da doença, integrariam dados clínicos, imagiológicos e laboratoriais, identificariam marcadores de prognóstico, e teriam critérios positivos e negativos, i.e. sinais tipicamente associados à doença, e sinais de alarme para diagnósticos alternativos, denominados “red flags”. Em relação a estes últimos, têm sido propostas listas de “red flags” neurológicos(127), genéticos (128) e psiquiátricos (129), que se destinam a alertar os neurologistas para diagnósticos alternativos na sua presença.

O diagnóstico diferencial da EM inclui uma lista muito numerosa de patologias que pertencem ao espectro das doenças desmielinizantes, ou que, não pertencendo, podem simular as manifestações clínicas desta doença (130, 131). Como vimos anteriormente, a separação da EM das outras patologias pertencentes ao seu grupo nosológico nem sempre é simples, mas tem vindo a tornar-se mais simples em virtude do desenvolvimento da tecnologia de imagem, e de biomarcadores específicos. A EM é considerada, classicamente, como uma entidade de difícil diagnóstico, dada a

heterogeneidade das suas manifestações, sobretudo no que diz respeito ao diagnóstico diferencial com patologias de outros grupos nosológicos. Enquanto que o erro diagnóstico residual, como mencionámos, ronda os 5-10% (63), a não confirmação do diagnóstico de EM após uma avaliação cuidada é um fenómeno mais frequente; em estudos recentes, a reavaliação diagnóstica por peritos em EM, normalmente em centros universitários, de casos referenciados com o diagnóstico provisório de EM, ou com forte suspeita baseada na clínica e exames de imagem, resultou em taxas de 17% a 72% de reclassificação, ou des-diagnóstico (64, 132-134).

As listas de diagnósticos diferenciais possíveis existentes são muito variadas, normalmente muito extensas (chegando num caso a atingir 100 patologias diferentes (135)), e incluem uma mistura heterogénea de doenças inflamatórias/reumatológicas, doenças cérebro-vasculares, doenças infecciosas, degenerativas, metabólicas e tóxicas, genéticas, oncológicas, alterações estruturais e patologias psiquiátricas; está muito para além do âmbito deste trabalho a sua enumeração ou discussão, pelo que remetemos o leitor para as obras de referência (130, 131, 135) Na maioria dos casos que conhecemos, estas listas têm sido elaboradas com base em casos esporádicos, ou pequenas séries de casos, provenientes da análise de erros diagnósticos – os mímicos da Esclerose Múltipla (131). Esta multiplicidade - inoportuna na prática - de diagnósticos possíveis, é, no entanto, mais aparente do que real. De facto, se atendermos ao seu perfil clínico de disseminação no tempo e espaço, em teoria poderia ter de ser necessário separar a EM de variadas outras doenças disseminadas no tempo (tumores, malformações arteriovenosas, mielopatias espondilóticas, malformações de CHIARI, paraparésias espásticas hereditárias, enxaqueca, leucodistrofias, etc.), disseminadas no espaço (vasculites primárias e secundárias do SNC, doenças mitocondriais, doenças infecciosas, sarcoidose, etc.), e disseminadas no tempo e espaço (doenças cérebro-vasculares incluindo o CADASIL, doenças autoimunes como o síndrome de SJÖGREN e o lúpus eritematoso disseminado, doença de Lyme, etc.). Mais ainda, se juntarmos a esta lista de mímicos baseados na clínica, a necessidade de diagnóstico diferencial

baseado nas alterações imagiológicas na RMN (e.g., alterações normais da idade, EMAD, vasculites, doença de BEHÇET, síndrome de SJÖGREN, lúpus, sarcoidose, CADASIL, enxaqueca, doenças cerebrovasculares, leucoencefalopatia multifocal progressiva, leucodistrofias, leucoencefalopatias tóxicas, linfomas do SNC, infecção pelos vírus HIV e HTLV, doença de Lyme), ou de bandas oligoclonais no LCR (e.g. neurosífilis, síndrome de SJÖGREN, EMAD, doença de Lyme, pan-encefalite esclerosante subaguda, doença de BEHÇET, sarcoidose, síndrome de DEGOS-KOHLMAIER, síndrome de anticorpos anti-fosfolipídicos, CADASIL), as dificuldades rapidamente se tornam insuperáveis.

Na prática, julgamos que o *caveat* presente nos critérios de diagnóstico desde os de SCHUMACHER, de não haver outra melhor explicação, não deve ser sobre-interpretado para a não existência de nenhuma outra explicação. O diagnóstico da EM é um processo, não uma ocorrência pontual, e deve integrar elementos clínicos, imagiológicos e laboratoriais; habitualmente, as manifestações clínicas típicas, associadas ao curso clínico expectável, e a alterações concordantes nos exames de imagem e laboratório, permitem afirmar o diagnóstico de EM pela positiva, e não somente após a exclusão de uma interminável lista de diagnósticos possíveis, mas indubitavelmente pouco prováveis. São os casos de EM pouco típica – habitualmente não cumprindo os critérios de diagnóstico, ou apresentando “red flags”, que nos devem fazer suspeitar da existência de outras patologias. Nestes casos, trata-se, sobretudo, ou de manifestações raras de doenças comuns (e.g., alterações da substância branca na enxaqueca, doença cerebrovascular no jovem, vasculites), ou manifestações comuns de doenças raras (e.g. CADASIL, leucodistrofias) (Figura 3). De qualquer forma, não deve ser esquecido que, na presença de um doente com manifestações clínicas suspeitas, mas atípicas, é estatisticamente mais provável tratar-se de uma EM que de outra patologia; a EM é a causa mais frequente de incapacidade neurológica no adulto jovem, e, conseqüentemente, a EM atípica mais frequente que qualquer outro dos seus mímicos potenciais (136). Este conceito de diagnóstico baseado na

tipicidade tem sido desenvolvido por FLEMING, que propõe a separação dos casos suspeitos de EM em quatro grandes grupos, baseados na tipicidade dos dados clínicos, imagiológicos e laboratoriais (Figura 4) (136). Como podemos ver, segundo este autor, cerca de metade dos doentes são, *a priori*, rapidamente identificáveis como EM ou não-EM; nos restantes, a maioria serão EM atípicas, e somente por volta de 5% correspondem a outras doenças neurológicas de difícil diagnóstico. Em qualquer destes dois últimos casos, justifica-se um diagnóstico diferencial cuidadoso, e um seguimento prolongado com reconfirmação periódica do diagnóstico de EM (136).

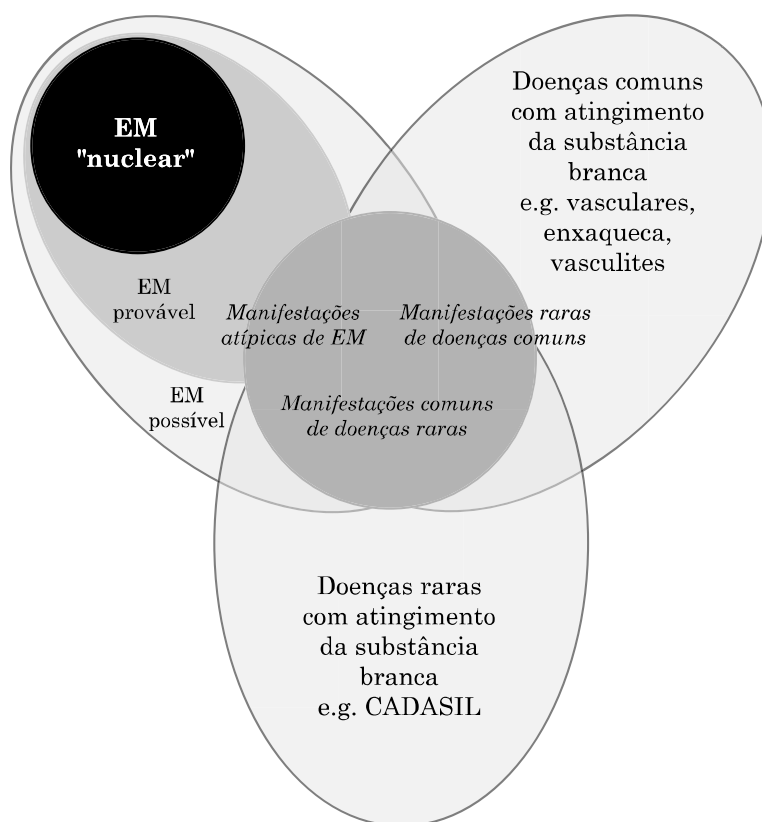


Figura 3. Problemas de diagnóstico diferencial entre a EM e outras doenças neurológicas. Entre a EM e outras doenças neurológicas com padrão de disseminação no tempo e espaço, o processo de diagnóstico diferencial pode ser facilitado com base em critérios de tipicidade (expresso no diagrama em código de tonalidade; quanto mais escuro, maior a tipicidade). Dividindo a EM em três grupos diagnósticos, de cada vez menor certeza, vemos que a sobreposição diagnóstica só existe para manifestações raras de doenças comuns da substância branca (como a doença cerebrovascular, ou a enxaqueca) e para as manifestações comuns de doenças raras da substância branca (como as doenças genéticas e.g. leucodistrofias ou CADASIL).

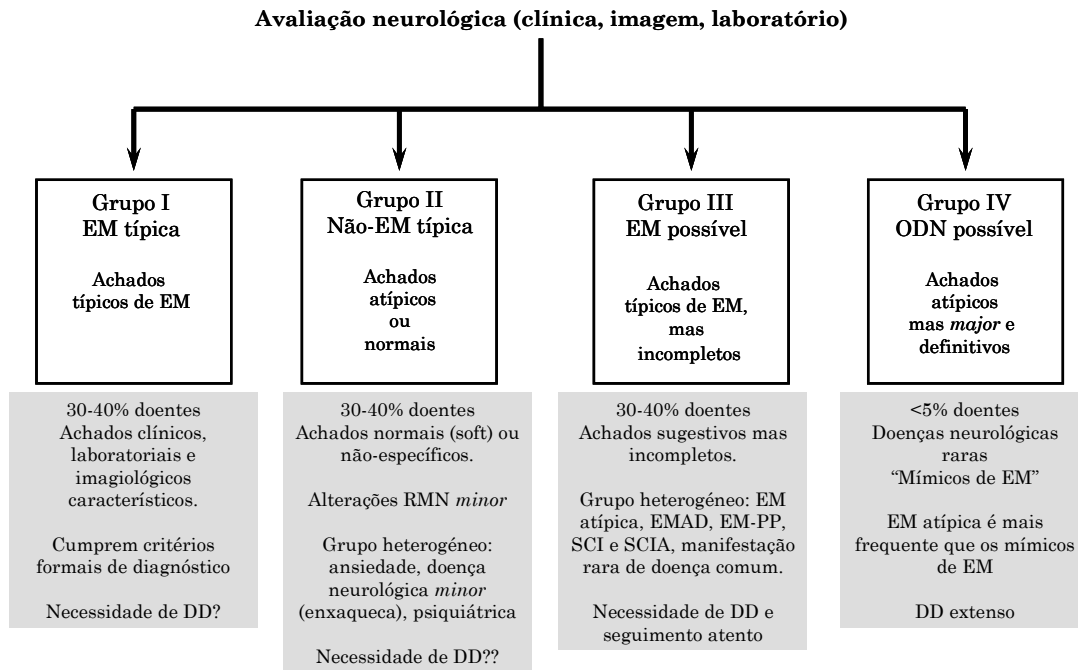


Figura 4. Esquema de diagnóstico por tipicidade. Após a avaliação inicial, os doentes são divididos em quatro categorias, baseadas no grau de tipicidade dos achados clínicos, imagiológicos e laboratoriais. Para os doentes de categoria I e II, nos quais todos os dados são concordantes e típicos, é questionável a necessidade de um diagnóstico diferencial (DD) extenso. Nos grupos III e IV, inverte-se esta tendência, e é necessária uma vigilância atenta e seguimento prolongado. DD – diagnóstico diferencial; RMN – ressonância magnética nuclear do neuro-eixo; EM – Esclerose Múltipla; EMAD – Encefalomielite Aguda Disseminada; SCI – síndrome clínico isolado; SCIA – síndrome clínico isolado atípico; ODN – outra doença neurológica. Adaptado e modificado de Fleming JO *Multiple Sclerosis diagnosis*, American Academy of Neurology 2006.

3. Etiopatogénese da Esclerose Múltipla – o Modelo-Padrão. Modelos experimentais – a Encefalomielite Autoimune Experimental. Estudos genéticos e etiologias infecciosas.

O esclarecimento inequívoco da causa última, ou *primum movens*, da Esclerose Múltipla, é um problema que continua a resistir, ao fim de quase 150 anos, aos mais dedicados esforços e persistentes investigações, de um considerável número dos mais brilhantes cientistas e médicos em todo o Mundo, provindos não só das ciências neurológicas mas, também, das novas disciplinas da Medicina Molecular, como a Imunologia e a Genética. Há algo

de misterioso e, ao mesmo tempo, fascinante, numa doença como a EM; surge espontaneamente em adultos jovens, muitas vezes de forma abrupta, por vezes de maneira mais insidiosa; apresenta uma grande heterogeneidade clínica, afectando múltiplas zonas do SNC isoladamente, ou em combinação; consente períodos de agravamento e remissão de forma autónoma, sem que seja possível identificar quais as regras que subjazem a estas flutuações; resiste tenazmente a várias formas de terapêutica, apesar de tudo parecer indicar que seriam eficazes. Várias teorias têm sido propostas, ao longo dos anos, para explicar o aparecimento das lesões desmielinizantes nesta patologia, bem como a sua disseminação e recorrência. No capítulo seguinte iremos abordar, brevemente, a evolução dos vários conceitos etiopatogénicos, culminando com o modelo-padrão (*standard model*) aceite, hoje em dia, de forma quase consensual, mas que, apesar disso, tem vindo a ser modificado gradualmente ao longo dos anos.

No modelo-padrão da fisiopatologia da EM, as manifestações clínicas desta doença são, genericamente, atribuíveis a dois fenómenos básicos: a ocorrência de lesões focais durante os períodos de surto clínico, e, principalmente, durante a fase inicial da doença, e uma progressiva perda axonal generalizada, manifesta, sobretudo, nas fases mais avançadas (12, 45). Posto de outra forma, a EM é uma doença que consiste em duas fases distintas, inflamatória e degenerativa; estas duas fases coexistem sempre, sendo que na fase inicial da doença predominam as alterações inflamatórias, enquanto que, na fase mais tardia, o componente neurodegenerativo de perda axonal progressiva torna-se mais aparente (137). As lesões desmielinizantes focais – placas desmielinizantes, a marca patológica característica desta doença – são o resultado de um processo inflamatório centrado essencialmente nos espaços perivenulares da substância branca, no qual participam vários componentes do Sistema Imune inato e adaptativo (Figura 5). Este ataque imune é orquestrado, primariamente, por linfócitos *Thelper* (Th) CD4+ auto-reactivos, específicos para antígenos presentes na mielina do SNC, e que segregam citocinas pró-inflamatórias, tais como o interferão gama (IFN γ) e o factor de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*,

TNF), tendo, portanto, um fenótipo Th1. Igualmente, têm vindo a ser reveladas evidências de que linfócitos T de fenótipo Th2 poderão contribuir, também, para a génese das lesões. Os linfócitos T_{citotóxicos} CD8+ são mais abundantes nas lesões que os Th, e o seu papel tem vindo a ser progressivamente mais conhecido, bem como a sua capacidade de provocar lesões parenquimatosas. Elementos do braço humoral da resposta imune encontram-se também presentes, tais como linfócitos B e anticorpos, com capacidade desmielinizante própria. Várias células com capacidade de actuar como apresentadoras profissionais de antígeno encontram-se presentes e expressam MHC classe II, tais como macrófagos e microglia; estas células têm igualmente capacidades efectoras próprias, incluindo a secreção de citocinas e de radicais livres de oxigénio. Adiante descreveremos, em maior detalhe, cada um destes actores do Sistema Imune na geração da lesão desmielinizante, que têm sido objecto de vários excelentes trabalhos de síntese (6, 138-144).

A consequência principal deste ataque imuno-mediado contra a mielina é a geração de uma lesão focal na qual há perda abundante de mielina (que se pode encontrar em grande parte fagocitada por macrófagos localmente presentes) e destruição axonal difusa. Concomitantemente com o aparecimento destas lesões, é detectável uma quebra da barreira hemato-encefálica, que persiste durante várias semanas, detectável através de RMN com injeção de contraste endovenoso (2, 3, 49). Estas lesões focais correlacionam-se bem com o aparecimento de sinais e sintomas de disfunção neurológica durante os surtos, e correspondem ao seu substrato patológico. Na sua evolução, algumas destas lesões desaparecem por completo, pelo menos do ponto de vista imagiológico, denominando-se, então, placas-sombra (*shadow plaques*), enquanto outras evoluem para lesões crónicas, com o desaparecimento gradual do componente inflamatório da lesão, e o desenvolvimento de cicatrizes gliais (143). As lesões desmielinizantes agudas apresentam-se muito hipercelulares (contendo, como acima referimos, numerosas células do Sistema Imune), com margens indistintas, e edema intersticial, e perdas axonais extensas e disseminadas. As lesões

crónicas têm, comparativamente, muito menos elementos celulares, menos danos axonais recentes e são muito mais bem delimitadas; algumas continuam a exibir sinais da presença de elementos da resposta imune - lesões crónicas activas - mas, com o passar do tempo, perdem estas características e desenvolvem uma cicatriz astrogial densa, contendo relativamente poucos axónios desmielinizados, alguns macrófagos, e raros oligodendrócitos (143, 145). O acumular destas cicatrizes, conjuntamente com uma progressiva perda axonal que ocorre de forma disseminada mesmo fora das lesões desmielinizantes, e, também, com um processo inflamatório crónico de localização cortical, leva nas fases mais avançadas da doença ao aparecimento de atrofia cerebral e medular difusa, correlacionada com o surgir de sinais clínicos de progressão de incapacidade neurológica e disfunção cognitiva (143, 145, 146). Vários mecanismos, ainda pouco conhecidos, contribuem potencialmente para esta fase de progressão crónica da doença, tais como elementos da resposta imune (linfócitos T e B, citocinas, diversificação de epítomos), células residentes localmente e que contribuem para a formação da cicatriz glial (astrócitos), alterações da distribuição e funções dos canais de sódio que permitem trocas reversas sódio-cálcio e os consequentes efeitos activadores nocivos do cálcio intracelular, défices de regeneração axonal e remielinização (mediados, pelo menos em parte pelas moléculas inibidoras da regeneração axonal como a Nogo, MAG e OMgp) e modificadores genéticos da resposta imune e regenerativa (revistos em (146, 147)).

Para além desta visão de síntese dos mecanismos de geração e progressão do substrato neuropatológico da EM, faz parte do mesmo modelo-padrão considerar que a EM é uma doença imuno-mediada que surge em indivíduos geneticamente susceptíveis, nos quais o contacto com algum tipo de agente infeccioso, numa altura específica da vida, leva a uma reacção imune cruzada, de características autoimunes, tendo como alvo primário a mielina do Sistema Nervoso Central. Esta reacção autoimune torna-se autónoma dos mecanismos de regulação normais, e gera uma doença autoimune, desmielinizante, crónica, a que chamamos Esclerose Múltipla.

À medida que diversos alvos para o Sistema Imune têm sido identificados – e continuam ainda a surgir novos candidatos – dentro do complexo supramolecular da mielina, a descoberta de fenómenos como os de mímica molecular, ou de diversificação de determinantes, bem como do papel das células reguladoras, têm levado a uma melhor compreensão dos mecanismos de origem e de perpetuação desta resposta imune desregulada (revisto em (1-3, 5, 6, 24, 120, 137, 139, 140, 144, 148, 149), e desenvolvido no próximo Capítulo).

Com base nestes conceitos, Howard WEINER sumariou estes conceitos na sua “hipótese unificadora de 21 pontos” sobre a etiologia e tratamento da EM (150), da qual mencionaremos, brevemente os primeiros 14 pontos: 1) a EM é uma doença autoimune dirigida contra antígenos da mielina tais como as proteínas MBP, PLP ou MOG; 2) não há um único autoantígeno devido à diversificação de epítopos; 3) a sensibilização inicial é devida a reactividade cruzada entre agentes infecciosos e a mielina do SNC, ou a uma infecção autolimitada do SNC que liberta antígenos; 4) células T auto-reactivas fazem parte do repertório imune normal, e o que determina a doença é o tipo de resposta imune que ocorre; 5) a geração de células T patogénicas é dependente de genes de MHC e não MHC; 6) factores ambientais determinam o tipo de resposta imune; 7) a EM não é causada por uma infecção viral persistente, embora agentes infecciosos tenham um papel central na sua génese; 8) há defeitos nos mecanismos reguladores ou tolerizadores da resposta imune; 9) as lesões de EM são provocadas pela migração de linfócitos T para o SNC; 10) existem subtipos de EM; 11) a EM-SR tem mecanismos de auto-regulação; 12) na passagem para a fase progressiva crónica as células T ficam cronicamente activadas; 13) a RMN reflecte o processo patológico; 14) a EM é muito semelhante à encefalomielite autoimune experimental, um modelo animal de conhecida etiologia autoimune (150).

A evidência de suporte deste modelo-padrão de etiologia e imunopatologia provém de várias áreas do conhecimento, com contributos de, entre outros, estudos epidemiológicos e de história natural (que já

discutimos, embora brevemente), estudos genéticos, anatomo-patológicos e imunológicos. Uma das principais fontes de *insight* fisiopatológico e imunopatológico, essencial para a compreensão da EM, e que tem servido, mais do que qualquer outra forma de investigação, para fazer avançar os nossos conhecimentos nesta área, é o modelo animal de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Este modelo experimental de EM foi desenvolvido a partir da década de 1930, na sequência de trabalhos desenvolvidos para explicar o aparecimento de acidentes neuro-paralíticos após vacinação anti-rábica (151, 152).

Tal como veremos em detalhe no próximo capítulo, a EAE evoluiu destes primórdios para se tornar no principal motor de investigação experimental sobre EM (e, em grande parte, sobre autoimunidade em geral), e no suporte principal para o desenvolvimento de novas formas de terapêutica (153). Há numerosas semelhanças entre este modelo e a Esclerose Múltipla, sobretudo no que diz respeito às manifestações clínicas e alterações histopatológicas (152): ambos compartilham uma susceptibilidade genética associada aos genes do MHC (sistema H-2 do ratinho, RT no rato (154)) e uma predisposição para o sexo feminino; existe uma associação dos surtos com factores ambientais como infecções; as alterações neuropatológicas (presença e composição dos infiltrados inflamatórios, desmielinização imuno-mediada, perdas axonais, patologia cortical) são muito semelhantes nas lesões agudas, e o espectro de manifestações (nevrite óptica, mielite, lesões periventriculares) e cursos clínicos (aguda monofásica, surtos e remissões, crónica progressiva) é muito idêntico (152, 153). A EAE, nas suas diversas permutações (consoante o protocolo de indução e animal experimental usado), reproduz as características de doença inflamatória, desmielinizante, imuno-mediada e sensível a algumas formas de terapêutica (152, 153). Tipicamente, a EAE é induzida em espécies de mamífero geneticamente susceptíveis - rato, ratinho, cobaio, coelho, macaco -, através da imunização com extractos da mielina do SNC emulsificados com um adjuvante imune (habitualmente o adjuvante completo de FREUND) destinado a estimular o Sistema Imune (Figura 6). Consoante a espécie de

animal, e a sua estirpe, o antígeno empregue nesta imunização é variável; os protocolos de imunização usam desde o antígeno mais genérico (homogeneizado de medula espinhal) até ao mais específico (sequências peptídicas de uma proteína de mielina como a MBP, MOG ou PLP, reconhecidas como imunodominantes).

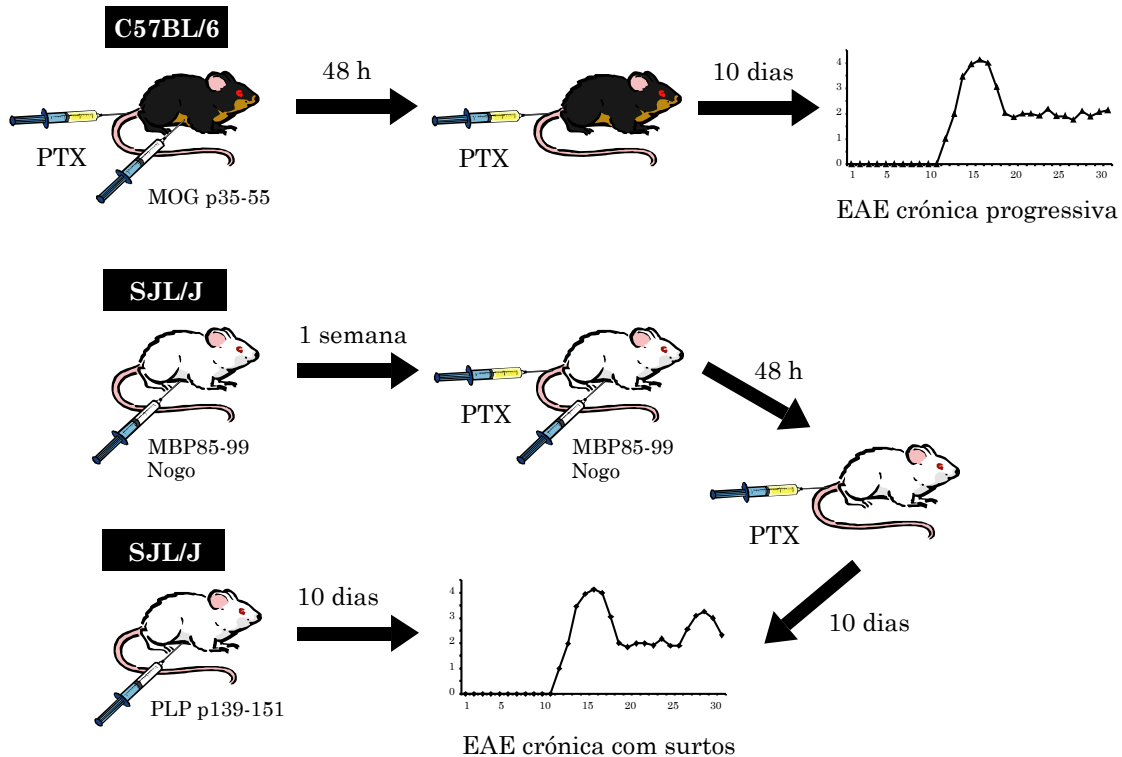


Figura 6. Protocolos de indução de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em ratinhos. Encontram-se ilustrados os protocolos *standard* de indução de EAE nas estirpes de ratinho C57BL/6 (H-2^u) e SJL/J (H-2^s) com os seus respectivos antígenos. Para a estirpe C57BL/6 (no topo), o protocolo de indução consiste numa imunização subcutânea com o seu antígeno *major* MOG35-55 (proteína MOG, péptido p35-55) emulsificado em adjuvante completo de FREUND (ACF), conjuntamente com duas injeções endovenosas de toxina pertússica (PTX). Obtém-se desta forma uma doença crónica, com recuperação incompleta e progressão após o primeiro surto (EAE crónica progressiva). Para a estirpe SJL/J (em baixo), o antígeno *major* é o péptido PLP p139-151, bastando uma única imunização subcutânea de emulsificado para induzir doença. Nesta mesma estirpe, protocolos de quebra de tolerância para antígenos *minor* (no meio) utilizam normalmente uma imunização inicial, seguida depois de um reforço de imunização, e nessa mesma altura, administração endovenosa de PTX. Nesta estirpe, a doença manifesta-se com um surto inicial, seguido de surtos espontâneos periódicos (EAE crónica com surtos).

É também possível a indução de doença por simples transferência de clones linfocitários T auto-reactivos contra estes antigénios da mielina, nomeadamente se estes tiverem um fenótipo pro-inflamatório (Th1), um dos principais dados que apoia o conceito da EAE – e da EM – como uma doença autoimune provocada por linfócitos T.

Do ponto de vista clínico, a EAE manifesta-se como uma mielite transversa ascendente, com paralisia da cauda seguida de paraparésia e incontinência urinária, paraplegia, tetraparésia e morte no contexto de tetraplegia e caquexia marcadas. Dependendo do modelo empregue, podem ser obtidas formas de EAE agudas monofásicas (e.g. rato Lewis imunizado com MBP68-86), crónicas progressivas (ratinho C57BL/6 imunizado com MOG35-55) e crónicas com surtos (ratinho SJL/J imunizado com PLP139-151) (Figura 6). Como adiante veremos, a capacidade de manipulação experimental do ratinho, com a criação de animais transgénicos e *knock-out*, tem possibilitado enormes avanços na nossa compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da EAE e, presumivelmente da EM. Na realidade, muito do conceito da EM como doença autoimune baseada na resposta anti-mielina é proveniente do modelo de EAE, e nem sempre de evidência proveniente de estudos baseados em doentes.

No que diz respeito à etiologia da EM, o modelo-padrão propõe uma interacção entre um risco associado ao *background* genético individual, e o contacto com algum agente infeccioso presente no meio ambiente. Como vimos acima, para a população caucasiana, este risco genético estaria associado ao repovoamento do continente europeu por um pequeno grupo fundador proveniente da Anatólia, durante o período Neolítico, cuja composição genética seria depois enviesada pelo contacto com múltiplas calamidades infecciosas, e que, finalmente, a partir do século XIX, teria encontrado um despoletante infeccioso sob a forma de uma infecção tardia com alguns agentes virais, como o vírus EPSTEIN-BARR (119).

Hoje em dia, a EM é vista, do ponto de vista genético, como uma doença de hereditariedade multigénica, no qual o peso individual de cada factor de risco genético não é muito grande, mas que no seu conjunto

conferem uma susceptibilidade individual para esta doença. Numerosos estudos têm sido realizados para avaliação do risco genético na EM em diversas populações, sobretudo na América e Europa do Norte (revistos em (155, 156), e uma discussão aprofundada dos mesmos está para além do âmbito deste trabalho. Todos os estudos populacionais, familiares e de gémeos demonstram um aumento substancial da prevalência da EM em familiares de doentes, dependente do grau de similitude genética: familiares de primeiro grau têm um risco entre 20-50 vezes (2-5%) superior à população normal, e as taxas de concordância entre gémeos monozigóticos rondam os 25% na maioria dos estudos (3, 139, 155, 157). Vários *screenings* genómicos foram já realizados, desde a década dos 1990, na tentativa de identificar regiões associadas à susceptibilidade para o aparecimento de EM (158-160). No geral, os resultados destes estudos tem sido desalentadores, com a identificação de alguns *loci* potencialmente associados (entre os quais predomina a região HLA do complexo major de histocompatibilidade), mas com baixas pontuações de associação (NPL – *non-parametric linkage*) – numa meta-análise dos estudos realizados até 2001, somente 8 regiões cromossómicas obtiveram resultados NPL acima de 2.0, sugerindo que a EM seja uma doença multigénica (161).

Outros trabalhos de base populacional tem sido propostos e realizados recentemente, cada vez mais baseados na cooperação internacional entre centros dedicados ao estudo da Esclerose Múltipla. Um estudo internacional, utilizando cerca de 6000 micro-satélites marcadores para estudar 3376 doentes com EM, 3409 controlos saudáveis, e 948 trios familiares, fruto de uma cooperação internacional no continente europeu (*Genetic Analysis of Multiple Sclerosis in EuropeanS* – GAMES) foi recentemente terminado, e os resultados implicaram, para além da região HLA (6p21), duas outras regiões cromossómicas (17q21 e 22q13) (162, 163); dados de dois centros portugueses, referentes a doentes do Norte do país foram incluídos neste estudo (164, 165). Noutra abordagem multinacional, foi estabelecido o *International Multiple Sclerosis Genetics Consortium* que pretende, entre outras coisas, realizar um estudo de associação baseado num mapa de blocos

de haplotipos (*Hap-Map*), com uma maior capacidade de detecção de regiões do genoma potencialmente interessantes (6). Resultados de um estudo de associação de alta definição, provenientes deste consórcio internacional, realizado em 730 famílias multiplex foram recentemente publicados, e confirmaram a associação à região 6p21, bem como às regiões 17q23 e 5q33 (166).

O estudo de formas familiares de EM poderia contribuir para a descoberta de genes individuais responsáveis pelo aparecimento desta doença. No entanto, embora desde o final do século XIX formas familiares da doença tenham sido descritas por EICHORST (1896, *Über infantile und hereditäre multiple sklerose*, citado em (162)), são muito raros os casos de EM familiar implicando mecanismos de hereditariedade mendeliana unigénica, e, menos ainda, aqueles em que se tem conseguido encontrar uma associação a algum *locus* cromossómico (155). Uma excepção a esta regra foi a identificação de mutações pontuais no gene *PTPRC* (*protein tyrosine phosphatase, receptor-type C*), codificador da proteína CD45, essencial à activação dos linfócitos T e B, em casos esporádicos e familiares de EM (167). Estas mutações levariam a um aumento da intensidade da sinalização, e, conseqüentemente, da activação destas células (168). No entanto, vários estudos populacionais não têm encontrado mutações nesta proteína, pelo que é ainda incerto qual seja a sua importância real no panorama desta doença (169-172).

O principal factor de risco genético para a EM parece estar localizado na região 6p21, associado aos genes do complexo major de histocompatibilidade no *locus* HLA (MHC – *major histocompatibility complex*; HLA – *human leukocyte antigen*), que se pensa contribuir entre 10-60% do risco genético (173, 174); este é, aliás, um dos principais dados que apoiam o conceito da EM como doença autoimune. A associação entre antígenos HLA e a EM tem uma longa história; entre os primeiros estudos, salientamos os de NAITO *et al.* (1972), e JERSILD *et al.* (1973), que encontraram uma associação com os antígenos HLA-A3, A7, e W18; na mesma altura, PATY *et al.* confirmaram o mesmo tipo de associação (175-

178). Os principais contribuintes para o risco, no entanto, parecem ser os genes HLA-DR e DQ, entre os quais o haplotipo DR15 (DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602) tem um papel preponderante para a população Caucasiana da Europa do Norte (174). Noutras populações europeias etnicamente diferentes, outras associações têm sido descritas (155); por exemplo, para a população da Sardenha, que possui características genéticas próprias, uma associação com os alelos DRB1*1501, DRB1*0301 e DRB1*0405 foi encontrada (179, 180). No que respeita à população portuguesa, poucos estudos tem sido realizados; destacamos nesta área os trabalhos, ainda preliminares, de Ana, e Berta, MARTINS DA SILVA, bem como de Edite RIO, que têm vindo a estudar as associações HLA-EM no Norte de Portugal (181-183). Os mecanismos de explicação para a associação HLA-EM propostos incluem a), uma capacidade de apresentação preferencial de conjuntos específicos de proteínas do próprio, motivada pelas características moleculares destes genes MHC (discutidas no capítulo seguinte); b), menor capacidade de selecção tímica negativa, permitindo a fuga de mais linfócitos auto-reactivos potenciais; c), selecção de um repertório linfocitário T auto-reactivo pela presença de resíduos específicos de interacção com o receptor da célula T (TCR); d), capacidade de expressão aumentada no SNC levando a uma maior apresentação de antígenos durante a resposta imune local; e), modificação da apresentação de antígeno por proteases, ou por moléculas classe II não polimórficas, como a HLA-DM e DO, que estão associadas na região 6p21.3; e f), mecanismos de sinalização intracelular diferenciais que levariam a modificações do fenótipo da célula apresentadora de antígeno (139). Enquanto que para os quatro primeiros mecanismos mencionados existe alguma evidência da sua importância (sobretudo para o primeiro), no que diz respeito aos restantes o seu contributo é, ainda, incerto.

Associações dos alelos HLA-DR e DQ com outros genes, ou com características clínicas, imagiológicas e imunológicas, têm, igualmente, sido reportadas; outras associações de risco, mas, também, de protecção, com vários antígenos HLA, encontram-se descritas na literatura (para uma

listagem recente, recomenda-se o trabalho de SOSPEDRA e MARTIN (139)). Por exemplo, genes associados com o haplotipo DR15 incluem os da família do factor de crescimento e transformação beta (TGF β – *transforming growth factor beta*), antígeno 4 associado aos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4 – *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen*), factor de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e antagonista do seu receptor (IL-1R), e receptor dos estrogénios (139). Qualquer destes genes tem, potencialmente, vários efeitos possíveis sobre a resposta imune, pelo que se presume possam exercer alguma influência durante o ataque autoimune à mielina do SNC. Vários outros genes candidatos, não associados à região HLA, têm sido alvo de estudos contraditórios, que parecendo estabelecer uma ligação em alguns casos são, depois, negados em trabalhos subsequentes (155). Este grupo heterogéneo de genes inclui, entre outros, alguns candidatos relacionados com a resposta imune (e.g., cadeia beta do TCR, CTLA-4, TNF, ICAM-1, CCR2 e 5, receptor alfa da IL-4, IL-10 e seu receptor alfa, etc.), mielinização (e.g., proteína básica da mielina, Notch4), factores de crescimento neuronal (e.g., *ciliary neurotrophic factor*), e metabolismo lipídico e hormonal (e.g., apolipoproteína E, receptores da vitamina D e estrogénios) (139, 155). Em resumo, a única associação genética comprovadamente importante para patogénese da EM continua a ser com os genes do sistema HLA que codificam as moléculas de apresentação de antígeno do complexo major de histocompatibilidade.

O contributo dos factores ambientais para a patogénese da EM é um tema gerador de interesse, dada a necessidade postulada de um factor despoletante, para além da susceptibilidade genética, no modelo-padrão. De facto, vários estudos epidemiológicos, bem como a ausência de concordância total entre gémeos monozigóticos, sugerem a importância de factores não-genéticos nesta doença. Entre os factores ambientais, tem sido chamada a atenção para vários factores associados ao sexo, estilo de vida, padrões de comportamento, geografia, nível económico (grau de industrialização), e contacto com agentes infecciosos (139). Estes factores poderiam contribuir para explicar a maior prevalência de EM nas mulheres e a influência da

gravidez, estudos de migração nos quais o risco de EM corresponde ao da região de partida se a idade for superior a 15-16 anos, e ao da chegada se inferior, a existência de um gradiente de prevalência Norte-sul no hemisfério Norte, e inverso no hemisfério Sul, exposição à luz solar, e contacto com poluentes ambientais, respectivamente (revistos em (139, 184). Relacionado com o nível económico e o estilo de vida é, também, o contacto com os agentes infecciosos infantis, e a “hipótese da higiene”; segundo esta, o retardar progressivo e mesmo a ausência, nas nações industrializadas, do contacto com as infecções da infância, leva ao enviesamento da resposta imune para formas hiperpolarizadas de resposta Th2 (com o consequente aumento de alergias) e Th1 (associada à autoimunidade) (185-188).

Para além do seu papel na génese de um repertório imune normal, os agentes infecciosos são, naturalmente, excelentes candidatos para factor desencadeante da Esclerose Múltipla, e por várias razões. A associação reconhecida entre infecções virais comuns e o aparecimento de surtos de EM (189), bem como de EMAD (revisto em (99)), pressupõe a capacidade destes agentes infecciosos despoletarem, ou pelo menos agravarem, a reacção imune anti-mielina. Mais ainda, a existência de doenças desmielinizantes virais no homem (leucoencefalopatia multifocal progressiva provocada pelo vírus JC) e em várias espécies de animal experimental (encefalomielite murina provocada pelo vírus de THEILER e vírus da hepatite murina), ou domesticado (cabras e ovelhas com o vírus Visna, cães com cinomose – “esgana” – provocada pelo *canine distemper virus* ou CDV) confirma o potencial patogénico destes agentes. A documentação de epidemias de EM, em comunidades de baixa prevalência e isoladas, após a migração de indivíduos provenientes de zonas de alta prevalência, como se supõe ter acontecido nas ilhas Faroe (como descrito nos trabalhos clássicos de John KURTZKE (190-196)) é, por sua vez, indicativo da possibilidade de algum agente infeccioso ser responsável pelo despoletar da doença. Por último, a presença de anticorpos oligoclonais no LCR dos doentes com EM é uma indicação de uma resposta imune iniciada e mantida por um antigénio, tal como nas infecções.

Os agentes infecciosos poderiam participar na etiopatogénese da EM de duas formas: ou como infecção persistente ou latente no SNC (por exemplo nos oligodendrócitos), capaz de se manter ao longo do tempo e gerar, periodicamente, surtos agudos associados à sua agudização ou reactivação; ou como factor despoletante de uma reacção autoimune que depois se autonomiza, e que reage, erradamente, contra alvos antigénicos do próprio em virtude de mecanismos moleculares como a mimetização ou a activação de espectador (*bystander activation*) (139, 197, 198). Actualmente, destas duas hipóteses, apesar da manutenção da primeira como possível, o consenso, reflectido no modelo-padrão, prefere a segunda (6, 149).

A existência de uma etiologia infecciosa para a Esclerose Múltipla foi postulada desde o final do século XIX por PIERRE MARIE (199-201), e, desde então, numerosos agentes infecciosos, reais ou imaginários, têm sido implicados na sua patogénese (no próximo capítulo abordaremos algumas destas teorias infecciosas). Esta longa lista inclui várias bactérias e vírus potencialmente causadores da doença, mas as evidências obtidas de estudos epidemiológicos, histopatológicos, imunológicos, análise de células do SNC em cultura para detecção de replicação viral ou efeitos citopáticos, e técnicas de biologia molecular, são contraditórias e não permitem uma associação específica, ou universal, com qualquer destes agentes patogénicos (revistas em (139, 197, 198)). Apesar de que a maioria dos agentes virais responsável pelas infecções comuns da infância (sarampo, papeira, varicela, etc.) foi já implicado em alguma altura, sobretudo pela sua capacidade de provocar EMAD (como acima referimos), uma meta-análise de 13 estudos populacionais de caso-controlo, que avaliou o impacto das infecções infantis sarampo, rubéola, papeira, tosse convulsa e varicela não encontrou qualquer associação entre estas e o aparecimento de EM; no entanto, os doentes com EM têm uma idade de infecção viral mais tardia (202). Recentemente, foram implicados microrganismos tais como a bactéria *Chlamydia pneumoniae*, e vírus pertencentes à família dos Herpervírus, Retrovírus, Coronavírus e Poliomavírus (197). Destes, são particularmente interessantes os dados referentes ao grupo dos Herpesvírus e Retrovírus, dada a sua capacidade de

causar infecções persistentes, o seu neurotropismo, natureza ubíqua, e capacidade de produzir infecções latentes e recorrentes (139).

Dos retrovírus, não existe qualquer evidência de associação do vírus HTLV-I, um candidato interessante dado o seu neurotropismo e envolvimento na patogénese da Paraparésia Espástica Tropical (197, 203). Um novo retrovírus, denominado MSRV, foi isolado por PERRON *et al.*, a partir de doentes com EM, mas o seu papel patogénico continua a ser pouco claro, e tem sido posto em causa como apenas um marcador inespecífico de neuroinflamação (204, 205). Agentes retrovirais endógenos (HERV, *human endogenous retrovirus*) são sequências genéticas, correspondentes a vírus potenciais ou a oncogenes, e que têm sido isolados a partir de amostras de doentes com EM e controlos normais; não é claro, ainda, qual o papel que os HERV poderão ter, mas podem encontrar-se respostas imunes contra os HERV nos doentes com EM, as proteínas codificadas por estas sequências endógenas têm capacidade neurotóxica, existem interacções complexas dos HERV com os Herpesvírus implicados na patogénese desta doença e foi postulado que os HERV possam servir como superantigénios capazes de estimular a resposta imune (206, 207).

Quase todos os membros da família Herpesvírus foram já associados à Esclerose Múltipla, com base em semelhanças epidemiológicas, distribuição geográfica, dados serológicos, e detecção de ADN ou antigénios virais no SNC; a lista inclui os vírus humanos herpes simplex (HSV) 1 e 2, varicela zóster (VZV), EPSTEIN-BARR (EBV), citomegalovírus (CMV), herpesvírus (HHV) 6, e os vírus aviários como o vírus de MAREK ou o herpesvírus do peru (208-210). Dois candidatos potenciais desta família têm atraído a maior parte da atenção nos últimos tempos: o herpesvírus 6 humano (HHV-6) e o vírus de EPSTEIN-BARR (197, 208). O HHV-6 é o agente causal da doença exantemática infantil Roséola, infecta cerca de 90% das crianças até aos 2 anos de vida, é neurotrópico e capaz de causar meningite ou meningoencefalite na infecção primária (211-213). A maioria dos dados que associam o HHV-6 à EM provêm de estudos de caso-controlo, comparando a detecção (por vários métodos) deste vírus ou de anticorpos no SNC, LCR,

soro e células mononucleares do sangue periférico de doentes e controlos saudáveis. Embora numa minoria dos doentes seja detectável um aumento de anticorpos anti-HHV-6, ou a presença de ADN viral no soro e LCR, os estudos são frequentemente contraditórios e inconsistentes (revisto em (197, 214)). O vírus EPSTEIN-BARR parece ser, actualmente, o candidato que reúne o maior consenso como agente implicado na patogénese da Esclerose Múltipla, embora, tal como para todos os anteriores, as evidências sejam, ainda, incompletas e, por vezes, controversas (197, 215, 216). O EBV tem um neurotropismo reconhecido e é capaz de, por si só, provocar várias doenças neurológicas do SNC, incluindo encefalites (217-219). Os dados epidemiológicos apoiam o envolvimento deste herpesvírus com base na prevalência universal (100%) de seropositividade para EBV nos doentes com EM, concentrações mais elevadas de anticorpos contra antígenos capsulares e nucleares, e a associação frequente da EM com uma mononucleose infecciosa precedente (197, 216). Recentemente, utilizando uma tecnologia de expressão proteica de larga escala e técnicas de mapeamento de epítomos para estudar a especificidade antigénica das imunoglobulinas oligoclonais no LCR dos doentes com EM, CEPOK *et al.*, confirmaram a existência de reactividade contra duas proteínas virais do EBV (BRRF2 e EBNA-1), o que sugere que este agente contribui para a reacção imune e expansão oligoclonal da resposta humoral no LCR, um dos mecanismos imunopatológicos determinantes na Esclerose Múltipla (220).

Duas recentes meta-análises epidemiológicas vieram confirmar a associação do EBV com a EM. Numa delas, após análise de vários estudos epidemiológicos (comparando um total de 1005 doentes e 1060 controlos), foi apurada uma taxa de risco de 13.5 entre os doentes com EM seropositivos e seronegativos, o que apoia o papel do EBV na etiologia desta doença (221). Igualmente, outra meta-análise comparando vários estudos sobre a relação entre a EM e a mononucleose infecciosa, confirmou uma associação positiva entre estas duas doenças, com um risco aumentado em 2.3 vezes (222). Os autores propuseram um modelo de estratificação de risco de EM com base no contacto com o EBV: nos indivíduos sem contacto, o risco seria praticamente

nulo, intermédio naqueles que sofrem um contacto durante a infância, e máximo para quem sofre a sua primo-infecção na adolescência ou mais tarde (222). Por último, num estudo prospectivo com cerca de 30 anos de duração, a detecção de anticorpos contra o complexo antigénico nuclear do EBV (EBNA, e especificamente o seu componente EBNA-1), foi associada a um aumento do risco relativo em duas vezes (2.1 para o EBNA total, e 1.8 para o EBNA-1) e foi associada ao aparecimento de sintomas de EM 15 a 20 anos depois (223). No seu conjunto, estes estudos apoiam o papel do EBV na patogénese da EM, e levam a um modelo no qual a infecção por este vírus, ocorrendo na adolescência ou idade de adulto jovem, e seguida uma ou duas décadas depois pelo aparecimento clínico da doença, e são, portanto, compatíveis não só com os dados clínicos e de história natural da doença, mas, também, com o modelo-padrão proposto.

As infecções virais em geral, e o EBV em particular, poderiam contribuir para a patogénese da EM, fundamentalmente de duas maneiras: ou constituindo uma infecção viral persistente no SNC, com reactivação periódica (e.g., por infecção dos linfócitos B que transportariam o vírus para este órgão); ou a reacção imune contra o EBV, gerada à periferia, levaria a uma resposta autoimune cruzada contra antígenos do SNC, através de mecanismos de mimetização molecular (Figura 7). Esta hipótese tem vindo a agregar cada vez mais apoios, uma vez que permite fazer a ponte entre a teoria infecciosa e autoimune da Esclerose Múltipla; igualmente, estudos recentes têm fornecido provas convincentes da existência de mimica molecular potencial entre antígenos do EBV e da mielina (224-228). Neste último cenário, a persistência da infecção EBV e sua reactivação periódica, levaria à progressiva expansão dos clones auto-reactivos durante vários anos, até ao ponto em que a resposta autoimune fosse capaz de gerar sinais clínicos de lesão da substância branca do SNC (Figura 7) (229).

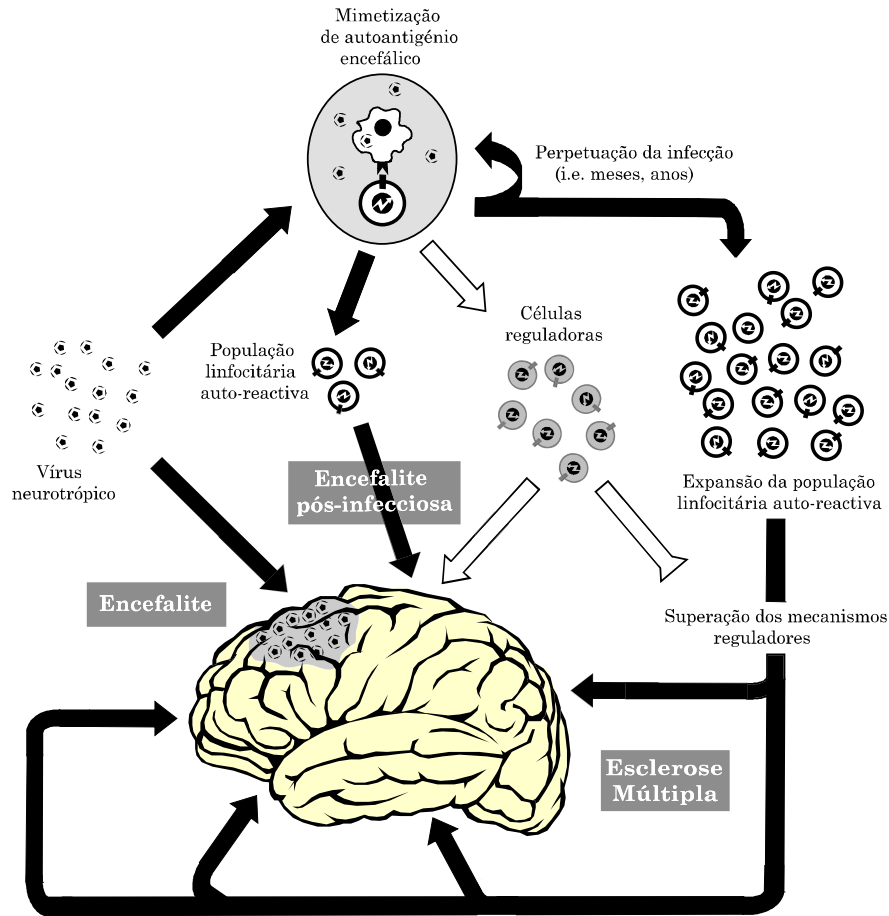


Figura 7. Contributo das infecções virais para a etiopatogénese da EM. Os vírus com capacidade neurotrópica (e.g. Herpesvírus-6, vírus Epstein-Barr) podem, para além de provocar infecção directa do SNC (encefalite), induzir uma resposta autoimune por estimulação de uma população linfocitária auto-reactiva após mimetização molecular de antígenos encefálicos (e.g. mielina), com consequente lesão do parênquima encefálico e desmielinização. Caso esta resposta seja controlada por mecanismos de regulação intrínsecos (linfócitos reguladores), o ataque autoimune é limitado, ocorrendo uma doença desmielinizante monofásica (encefalite pós-infecciosa, e.g. EMAD). No entanto, caso estes mecanismos falhem, ou a infecção persistente leve à expansão progressiva da população linfocitária encefalitogénica para além da capacidade de regulação/supressão, podem ocorrer múltiplos ataques ao longo do tempo (Esclerose Múltipla).

4. Caracterização histopatológica das lesões de Esclerose Múltipla e heterogeneidade patológica. Mudanças de paradigma etiopatogénico com base na patologia.

A definição da Esclerose Múltipla como entidade nosológica partiu, em grande medida, da descrição anatomo-patológica, feita por CARSWELL (1838) e CRUVEILHIER (1835) na primeira metade do século XIX, de casos de encefalomyelite crónica com lesões esclerosadas disseminadas; aliás, ao longo de todo esse século, vários patologistas alemães foram contribuindo com importantes observações histológicas sobre esta doença, entre as quais a da natureza fundamentalmente desmielinizante das lesões (FROMANN (1864), e da sua localização perivascular (RINDFLEISCH, 1863) (revisto em (230)). A tradição anátomo-clínica, mantida no Hospital da *Salpêtrière* por CHARCOT e seus discípulos, e em grande parte responsável pelo prestígio da escola parisiense, baseava-se numa forte dependência de estudos histopatológicos detalhados, e quer CHARCOT, quer BABINSKI publicaram trabalhos detalhados sobre a patologia da EM (231, 232).

Existem vários, excelentes textos de referência (233) sobre a patologia da EM, e não é nossa intenção proceder, neste trabalho, à sua revisão extensiva. A caracterização da lesão característica, ou marca, da EM, a placa desmielinizante, contribuiu enormemente para a nossa compreensão da etiopatogénese da doença. Os elementos fundamentais da placa – desmielinização focal, inflamação, cicatriz astrogliar, perda axonal – reflectem, directamente, a fisiopatologia da doença, e o seu estudo está indissociavelmente ligado ao estabelecimento do modelo-padrão que acima resumidamente descrevemos (143, 146, 147, 233-235). Curiosamente, após o estabelecimento do padrão neuropatológico típico durante o final do século XIX, e, até muito recentemente, a patologia pouco contribuiu para a evolução dos conceitos fisiopatológicos das doenças desmielinizantes, função que foi, sobretudo, desempenhada pelo estudo da imunopatologia dos modelos experimentais como a EAE.

Na última década, no entanto, houve um ressurgir de interesse na patologia da EM, motivada sobretudo pela “redescoberta” do papel das perdas axonais pelo grupo de Bruce TRAPP, e da heterogeneidade histopatológica nesta doença, fruto da colaboração entre Claudia LUCCHINETTI, Wolfgang BRÜCK e Hans LASSMANN. Com base nos estudos histopatológicos destes investigadores, foi modificada a nossa percepção da patogénese da EM, e foram propostos novos conceitos que põem em causa a unicidade nosológica desta doença, bem como a sua etiologia imune (236-238). Progressivamente, outras técnicas têm vindo a ser aproveitadas para o estudo do substrato patológico das doenças desmielinizantes; por exemplo, a utilização da RMN, não só para avaliação do número e localização das lesões desmielinizantes, mas, também, para caracterização do impacto da doença sobre a substância branca de aparência normal e córtex, através de espectroscopia protónica ou transferência de magnetização (49-51, 239). O desenvolvimento de tecnologias de análise genómica e proteómica, descritas acima, tem, igualmente, permitido a descoberta de novos mecanismos moleculares potencialmente importantes para a patogénese da placa (143, 240). Iremos, de seguida, abordar algumas das questões actualmente mais relevantes, e discutir o seu impacto sobre os nossos conceitos acerca da fisiopatologia da Esclerose Múltipla, a saber: heterogeneidade patológica, patologia axonal e da substância branca de aparência normal, perda axonal, e remielinização (235).

Se considerarmos a lesão-marca da EM, i.e., a placa desmielinizante, vários são os mecanismos potenciais que poderão levar ao seu aparecimento; de facto, é possível gerar lesões desmielinizantes experimentalmente através de uma série de processos, que incluem produtos tóxicos, alterações vasculares, e vários elementos da resposta imune, quer inespecíficos, quer dirigidos contra antigénios presentes no SNC. (235) Veremos, aliás, no próximo capítulo, como estes modelos influíram nas teorias etiológicas da EM ao longo do tempo. Em qualquer dos casos, a célula-alvo é o oligodendrócito, responsável pela formação da bainha de mielina, e o resultado final é a destruição desta substância complexa, e subsequente

fagocitose dos seus resíduos por células detritívoras (*scavenger cells*), como os macrófagos (233). Na base do processo desmielinizante poderão estar várias causas: lesão directa com necrose oligodendrocitária (e.g., no contexto tóxico ou inflamatório), morte oligodendrocitária por apoptose, ou gliopatia com morte periférica (*dying-back gliopathy*), na qual um insulto subletal ao corpo celular do oligodendrócito leva à degeneração das regiões metabolicamente mais distantes, ou seja, da bainha de mielina juxta-axonal, com perda precoce da glicoproteína associada à mielina (MAG) (233-235, 241). Vários factores, muitos dos quais pertencentes à resposta imune, foram já julgados capazes de lesionar directamente o oligodendrócito ou a mielina, entre os quais o ataque directo ou indirecto de linfócitos T_{citotóxicos} CD8+ (por descarga dos grânulos contendo granzimas e perforina, ou por interacção Fas-Fas ligando), excitotoxicidade por glutamato, reacções de ligação de anticorpos com activação do complemento, mediadores pró-inflamatórios, radicais livres de oxigénio e óxido nítrico (Figura 5). A oligodendropatia com morte periférica é encontrada, habitualmente, em lesões vasculares-tóxicas, ou virais, do corpo celular (143, 235, 241, 242)).

Sem dúvida, uma das mais importantes questões recentemente levantadas prende-se com a heterogeneidade dos achados patológicos encontrados nos doentes com doenças desmielinizantes primárias. Com base numa colaboração internacional (o *Multiple Sclerosis Lesion Project*) entre os laboratórios de Claudia LUCCHINETTI, Hans LASSMANN e Wolfgang BRÜCK, foram minuciosamente examinados 83 casos de EM (51 biópsias e 32 autópsias), incluindo casos de EM aguda tipo MARBURG, casos de EM aguda precocemente detectada, e EM crónica activa. A análise destes casos revelou a existência de dois tipos fundamentalmente diferentes de achados neuropatológicos nas lesões observadas (376 lesões); um grupo com semelhanças patológicas com a EMAD e as encefalomielites autoimunes, e outro com sinais predominantes de distrofia oligodendrocitária (242, 243). Estes dois grupos eram, por sua vez, subdivisíveis em dois, gerando quatro padrões neuropatológicos distintos: padrão I (15% dos casos), caracterizado por uma resposta imune mediada por células T e macrófagos; padrão II (58%

dos casos), na qual predomina a deposição de anticorpos e complemento; padrão III (26% dos casos), correspondendo a uma oligodendropatia com morte distal e perda de MAG; padrão IV (1% dos casos), evidenciando sinais de disfunção oligodendrocitária primária, com apoptose do corpo celular (234, 242) (Figura 8). No entanto, apesar desta heterogeneidade aparente, para cada doente só foi possível observar um único tipo de lesão, i.e. à heterogeneidade interindividual opõe-se uma homogeneidade intra-individual. Enquanto os três primeiros padrões existiam em todas as apresentações clínicas, o padrão IV encontrava-se limitado às formas primariamente progressivas, cuja restante caracterização neuropatológica foi recentemente estudada (244). Uma das principais críticas deste trabalho foi a sua dependência de um grande número de biopsias, nas quais pode ser muito difícil distinguir EM de EMAD; uma análise do curso clínico destes doentes, após biopsia, confirmou que a maioria desenvolveu EM clinicamente definitiva, e que, apesar da heterogeneidade patológica encontrada, não houve qualquer correlação entre o padrão patológico (I, II ou III) e o curso clínico subsequente durante o tempo de seguimento (245). À medida que o trabalho tem prosseguido (com um total de 286 casos numa revisão recente), estes padrões patológicos têm-se mantido inalterados (235).

Estes resultados levam à presunção de que, por detrás desta heterogeneidade histopatológica exista, igualmente, uma heterogeneidade fisiopatológica e até mesmo nosológica; a EM poderia ser, dessa forma, não uma, mas quatro doenças fundamentalmente diferentes, com mecanismos próprios, mas fenótipos semelhantes. Essencialmente, existiria uma EM imuno-mediada em cerca de dois terços dos doentes (padrões I e II) e uma EM “vascular/tóxica/viral” (padrão III) no restante terço, com o padrão IV reservado para raros casos primariamente progressivos. Outros subtipos de doença desmielinizante têm sido associados, também, a padrões patológicos específicos: a doença de DEVIC parece ter apenas lesões de tipo II, enquanto que a esclerose concêntrica de BALÓ, lesões tipo III (95, 242, 246). Com base nestes resultados, é presumível que mecanismos imunes ligados à resposta humoral e Th2 predominem na neuromielite de DEVIC, e a patologia

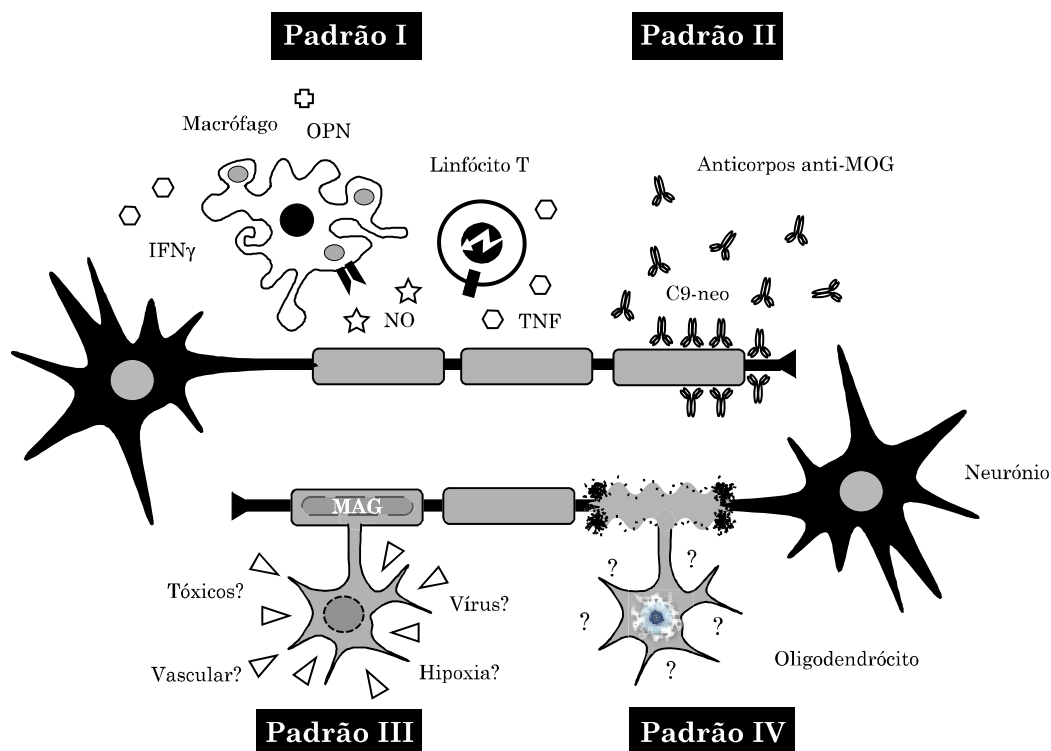


Figura 8. Padrões patológicos nas lesões desmielinizantes (I). Aparentemente semelhantes no geral, quatro padrões neuropatológicos fundamentais foram identificados: I - dominado pela resposta celular T e macrofágica; II - presença de anticorpos e complemento; III - oligodendropatia provocada por uma agressão de natureza incerta, incluindo tóxicos, infecções virais, lesões vasculares e hipóxia, e resultando numa perda preferencial da MAG (oligodendropatia de morte periférica); IV - apoptose oligodendrocitária primária, de causa desconhecida. Os padrões I, II e III correspondem à esmagadora maioria dos casos de EM, correspondendo às formas EM-SR e EM-SP, bem como às formas mais raras como a doença de DEVIC ou de BALÓ. O padrão IV só foi descrito em formas primariamente progressivas, menos de 1% das lesões estudadas (baseado nos trabalhos de LUCCHINETTI, BRÜCK e LASSMANN). IFN γ - interferon gama; OPN - osteopontina; NO - *nitric oxide*; TNF - *tumor necrosis factor*; C9-neo - nono factor do complemento.

característica da doença de BALÓ é explicável pelo pré-condicionamento hipóxico do parênquima encefálico, como acima já descrevemos. Estas diferenças de mecanismo fisiopatológico poderiam ser exploradas para melhor escolher as formas de terapêutica (242) e, de facto, foi recentemente reportado que doentes com lesões de padrão II (humoral) têm melhor resposta terapêutica à plasmáfereze em casos de EM aguda, o que faz sentido tendo em conta o efeito desta terapia na remoção de anticorpos em circulação (247).

Uma hipótese alternativa a esta heterogeneidade patológica foi proposta, ultimamente, por BARNETT e PRINEAS, que descreveram, nas lesões agudas desmielinizantes agudas, uma dissociação entre o aparecimento de sinais de disfunção oligodendroglial, e activação microglial, e a presença de sinais clássicos de inflamação (248). Os mesmos autores tinham reportado, previamente, uma ausência de sinais inflamatórios nas lesões crónicas activas em expansão, nos casos de EM secundariamente progressiva (249). Segundo estes autores, a heterogeneidade patológica proposta por LUCCHINETTI *et al.*, corresponde, apenas, a uma diversidade temporal e não a uma heterogeneidade fisiopatológica. As lesões agudas de EM passam por uma fase inicial – a lesão prefagocítica – na qual há apoptose oligodendroglial seguida de activação da microglia residente; a desmielinização é mediada sobretudo por macrófagos, derivados da microglia residente, e que actuam, simplesmente, como células detritívoras (237, 241). De forma a integrar a presença subsequente da reacção inflamatória (claramente detectável nas lesões) neste modelo, é postulado que a morte oligodendrocitária e a fagocitose da mielina por macrófagos leve à apresentação de autoantigénios, ou que, em alternativa, a mesma noxa que provoca a apoptose oligodendroglial e activação microglial (e.g., uma infecção viral, ou um produto tóxico) leve também à activação do Sistema Imune (Figura 9) (237). Este tipo de paradigma fisiopatológico, em que a lesão prefagocítica corresponderia, no fundo, ao padrão III de LUCCHINETTI, propõe que as lesões agudas de EM comecem por este padrão, e de seguida evoluam para os padrões I e II, associados à clássica resposta inflamatória. Naturalmente que uma das grandes deficiências assinaláveis nos trabalhos de LUCCHINETTI – ou em qualquer trabalho baseado na neuropatologia – é que as alterações observadas são apenas um fragmento da realidade, uma “fotografia” instantânea, e que não reflectem, necessariamente, nem a complexidade, nem a evolução dinâmica das lesões, pelo que o modelo de PRINEAS poderá ser verdadeiro. No entanto, os resultados deste autor não devem ser sobre-interpretados (até pela pequena

quantidade de amostras examinadas), até que outros investigadores os possam confirmar independentemente.

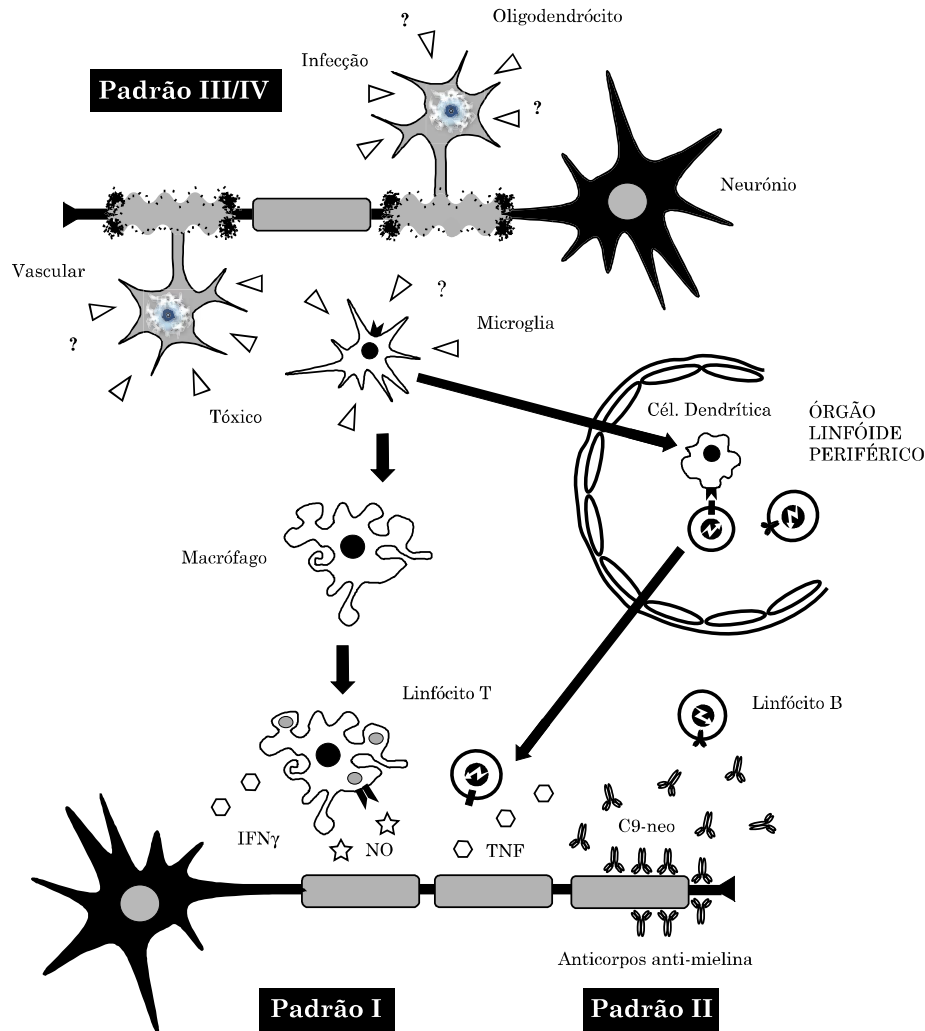


Figura 9. Padrões patológicos nas lesões desmielinizantes (II). As lesões desmielinizantes têm essencialmente duas fases evolutivas. Numa fase inicial – fase pré-fagocítica – ocorre morte oligodendrocitária e activação microglial, em virtude de vários tipos potenciais de noxa, tais como infecções, tóxicos e lesões vasculares (padrão III/IV). De seguida, dá-se uma migração de células apresentadoras de antígeno, ou o transporte de autoantígenos para os órgãos linfóides periféricos, resultando na activação de uma população de linfócitos autorreactiva capaz de migrar de volta para o SNC. Localmente, o mesmo estímulo que produz a lesão oligodendrocitária leva à activação do Sistema Imune, gerando uma reacção inflamatória. Esta resposta integra não só as células detritívoras activadas localmente (macrófagos), mas também os linfócitos e anticorpos anti-mielina gerados à periferia (padrões I e II). IFN γ – interferon gama; TNF – *tumor necrosis factor*; NO – *nitric oxide*; C9-neo – nono factor do complemento.

Tem sido, frequentemente, sustentado que a presença de lesões desmielinizantes focais não é suficiente para explicar a fase progressiva da doença, em que aparecem, a par do aumento inexorável da incapacidade neurológica, sintomas atribuíveis a disfunção cortical difusa, como as alterações cognitivas, e atrofia encefálica e medular. Trabalhos publicados nos últimos anos têm contribuído para esclarecer o substrato neuropatológico destas alterações (235, 236). A existência de lesões focais na substância cinzenta é um fenómeno bem conhecido dos patologistas, e têm vindo a ser descrita a presença de desmielinização subpial na ausência de respostas inflamatórias exuberantes (250, 251). No que diz respeito à substância branca de aparência normal (SBAN), vários estudos neuropatológicos e o uso de técnicas sofisticadas de RMN têm revelado evidências de desmielinização, inflamação e perda axonal difusa e vasta (234, 235, 252-254). Mais recentemente, KUTZELNIGG *et al.*, estudando as alterações neuropatológicas da SBAN e córtex em 52 casos de autópsia (do *Multiple Sclerosis Lesion Project*), confirmaram a existência de alterações disseminadas da SBAN, e evidência de desmielinização cortical extensa, associada a uma reacção inflamatória microglial, sobretudo nos casos primária e secundariamente progressivos (255). No seu conjunto, estes resultados apontam para um conceito patogénico da EM como uma doença global do SNC, em que numa fase inicial predominam as lesões focais da substância branca, mas em que, paulatinamente, se vão acumulando danos difusos no restante parênquima, em virtude de uma reacção inflamatória disseminada e indetectável pelos meios usuais, mas que se traduz em atrofia, incapacidade neurológica e disfunção cognitiva.

A segunda grande mudança do paradigma da Esclerose Múltipla foi o reconhecimento do papel da perda axonal como factor contributário para a disfunção neurológica. Inicialmente descrita por CHARCOT, a focalização excessiva na desmielinização e seus mecanismos durante o período que se seguiu levou a que, quando começaram a aparecer estudos quantitativos detalhados sobre perdas axonais nas lesões desmielinizantes, no final dos anos 90 do século passado, houvesse uma súbita revolução conceptual,

passando a EM a ser considerada, também, como doença axonal, potencialmente degenerativa (235, 256). Os trabalhos de FERGUSON *et al.*, e TRAPP *et al.*, utilizando marcadores de dano axonal agudo como a proteína precursora do amilóide, ou estudos detalhados de microscopia confocal, revelaram que, nas lesões desmielinizantes agudas existia ampla perda axonal, e que esta era tanto maior quanto mais aguda, e inflamatória a lesão (257, 258). Progressivamente, com base em numerosos estudos neuropatológicos, e utilizando técnicas de RMN, tem vindo a ser aceite, de forma cada vez mais consensual, que as lesões axonais na EM são precoces, graves e disseminadas, que constituem a maior parte do substrato patológico da incapacidade neurológica nas fases progressivas da doença (revisto em (256)). Há vários mecanismos potenciais de dano axonal, e que incluem a perda do suporte metabólico e protecção da bainha de mielina, e danos directos provocados pelos componentes do Sistema Imune, tais como os linfócitos T CD8+ (capazes de provocar transsecções axonais), anticorpos e complemento, ou proteases e radicais livres de oxigénio libertados por macrófagos e microglia. Após este insulto inicial, é activado um programa de degeneração axonal, incluindo alterações da membrana e citoesqueleto, alterações do equilíbrio e fluxo iónicos, consequência de um microambiente tóxico/inflamatório, levando à sua destruição progressiva (147, 259). Mais ainda, a capacidade regenerativa dos axónios no SNC encontra-se gravemente comprometida pela presença de vários inibidores do recrescimento axonal, e que têm vindo a ser progressivamente identificados, como a MAG, a OMgp ou a proteína Nogo-A (um dos principais temas do nosso trabalho) (revisto em (260, 261). O problema da regeneração axonal é, naturalmente, de suma importância para a terapêutica da EM, uma vez que, se quisermos recuperar défices existentes, teremos necessariamente de, para além de impedir a desmielinização imuno-mediada e a perda dos axónios, promover o seu recrescimento e remielinização (262, 263).

A capacidade de remielinização das lesões focais é sobejamente conhecida (as placas sombra), e acontece numa percentagem significativa (até 28%) dos casos, e até metade da área lesional (235). No entanto, como as

evidências patológicas demonstram, a capacidade de remielinização não é total, e esgota-se com o tempo. Múltiplos factores contribuem, provavelmente, para este fenómeno. A perda progressiva de precursores oligodendrocitários nas lesões crónicas foi apontada como um dos factores importantes para a incapacidade de remielinização (264), embora, em alguns trabalhos, tenha sido possível identificar estas células em número e funcionalidade normais (265). Sendo esse o caso, têm de existir outros mecanismos que impedem estas células pré-mielinizantes de actuar. Entre eles, a expressão dos factores de transcrição Olig1 e Olig2 por parte destas células foi recentemente descoberta como fundamental para o processo de remielinização; enquanto que o Olig2 é necessário para o desenvolvimento oligodendrocitário durante a maturação do SNC, as funções do Olig1, sendo menos conhecidas, parecem estar relacionadas com a capacidade de restauração de lesões no SNC adulto (266). Por outro lado, a activação da via Jagged-Notch-Hes nos precursores oligodendrocitários, provocada por mediadores inflamatórios presentes nas lesões inflamatórias (como o *transforming growth factor beta*, TGFβ), resulta no impedimento da sua maturação e da mielinização (267).

Como pudemos ver, tal como no início os estudos neuropatológicos contribuíram para o estabelecimento nosológico, e para o estabelecimento do conceito da EM como doença desmielinizante, inflamatória, primária do SNC, mais recentemente têm sido um dos principais motores de uma revolução paradigmática que inclui o carácter heterogéneo das lesões, com a consequente possibilidade de vários mecanismos etiopatogénicos, o contributo das perdas axonais e dos problemas da remielinização, e o reconhecimento do carácter anatomicamente global das alterações patológicas, e da vertente neurodegenerativa desta doença. No entanto, não deve ser esquecido que, apesar destas modificações, em grande medida a EM continua a ser uma doença imuno-mediada, se não autoimune, e, como tal, a compreensão dos mecanismos imunopatológicos é uma prioridade para o desenvolvimento de formas de terapia eficazes.

5. Imunopatologia da Esclerose Múltipla. Conceitos de autoimunidade. Componentes principais da resposta imune inata e adaptativa, e antígenos-alvo. Dinâmica da reacção autoimune.

O contributo do Sistema Imune (SI) para a etiopatogénese da Esclerose Múltipla encontra-se plenamente demonstrado, dada a quantidade e variedade de provas circunstanciais existentes. De facto, a associação da doença com determinados alelos HLA, os numerosos estudos histopatológicos que demonstram a presença de vários componentes celulares e humorais da resposta imune nas placas desmielinizantes, as semelhanças clínicas e histopatológicas da EM com as encefalomyelites pós-infecciosas, a detecção de alterações de expressão de genes relacionados com a resposta imune no parênquima encefálico destes doentes, e a detecção de anomalias na sua resposta imune, todos eles apontam para um papel central da resposta imune nesta doença. A estes, outros dois importantes argumentos são frequentemente agregados para justificar o conceito da EM como doença imunológica: a resposta a terapêuticas imunomoduladoras, ou imunossupressoras, e as semelhanças clínicas e patológicas com o modelo experimental de EAE (139, 268, 269). Já anteriormente comentámos o papel que a Encefalomyelite Autoimune Experimental tem desempenhado no desenvolvimento do modelo-padrão actual da etiopatogénese da Esclerose Múltipla. No que respeita ao outro ponto, tem havido, sobretudo ao longo dos últimos anos, numerosas demonstrações da influência do SI na Esclerose Múltipla, com base na resposta clínica e imagiológica a várias formas de terapêutica; todas as medicações utilizadas neste momento (e.g., interferão beta, acetato de glatiramero, imunoglobulinas endovenosas, mitoxantrona, etc.) para modificar o curso clínico da EM actuam quer como imunomoduladores, quer como imunossupressores - modificando o padrão de resposta, ou impedindo a acção do SI, respectivamente. Igualmente informativos têm sido os exemplos de terapêuticas imunomoduladoras cujos ensaios resultaram em agravamento da doença, sublinhando, assim, a importância da resposta imune na EM: a utilização de interferão gama (270,

271), moléculas de fusão de imunoglobulina com o receptor do TNF (lenercept) (272) e, mais recentemente, de um ligando peptídeo alterado do antigénio MBP83-99 (273), todos resultaram num aumento da actividade da doença, traduzida em surtos clínicos e lesões desmielinizantes detectáveis por RMN.

Apesar do anteriormente dito, não é claro, no entanto, em que medida a EM será, apenas, uma doença imuno-mediada, ou, na verdade, uma doença autoimune. A diferença estaria essencialmente no saber se a participação do SI na etiopatogénese da EM seria como causa primária, ou, apenas, como mecanismo efector – com as necessárias implicações terapêuticas. A resposta a esta questão não é simples, e, de facto, continua a suscitar polémica na literatura (274-276). O próprio conceito de autoimunidade tem vindo a modificar-se ao longo dos anos, passando de uma “era das trevas” dominada pelos conceitos do “horror autotoxicus” de EHRLICH, e do censor tímico de BURNETT, para a “era das luzes” actual, em que a auto-reactividade é considerada um fenómeno normal, fisiológico, e a doença autoimune acontece no contexto de alterações quantitativas da dinâmica de repertório imune e da sua regulação, resultante de múltiplos factores etiológicos (revistos em (277-281).

Se atendermos aos critérios de WITEBSKY-ROSE, só existe evidência indirecta, e circunstancial, de que a Esclerose Múltipla seja uma doença autoimune (282). Propostos por WITEBSKY em 1957 (em estudos relacionados com a tiroidite autoimune (283)), e baseados nos postulados de KOCH, estes critérios estabeleciam, para a definição de uma doença autoimune, a necessidade de identificação de um anticorpo ou resposta celular específica para um antigénio presente no órgão-alvo, e a indução de uma resposta autoimune análoga num modelo experimental com manifestações clínicas semelhantes (283). Mais tarde, a revolução no conceito de autoimunidade, levou à necessidade da modificação destes critérios, uma vez que a presença de auto-reactividade celular ou humoral passou a ser considerada um fenómeno normal. Em virtude disso, ROSE e BONA (282) definiram critérios de prova directa ou indirecta para

diferenciar entre a resposta linfocitária auto-reactiva normal e patológica; em última análise, o conceito de auto-reactividade patológica passou a basear-se na capacidade de transferir doença de um indivíduo para outro através de anticorpos ou células, e a na existência de destruição do órgão-alvo (282). Desta forma, enquanto para as doenças mediadas por anticorpos existem várias “experiências da natureza” que provam, directamente, o conceito (e.g., miastenia neonatal), para todas as doenças mediadas por células as provas teriam sempre de ser indirectas e circunstanciais, pela impossibilidade (técnica e ética) de realizar transferências celulares de doentes para controlos saudáveis.

Como iremos detalhar no próximo capítulo, a Esclerose Múltipla cumpre todos os critérios de prova indirecta: indução de modelos experimentais por autoantigénios, transferência de doença por células nos modelos, existência de modelos genéticos de doença, identificação de anticorpos e células T nas lesões, e presença de autoanticorpos ou linfócitos T auto-reactivos nos doentes (282). Por último, os nossos conceitos sobre a interacção entre o Sistema Nervoso Central, e o Sistema Imune, têm sofrido grande evolução, com a passagem de um conceito do SNC como local “imunoprivilegiado” (i.e., em que a tolerância aos antigénios do SNC era mantida sobretudo em virtude da ausência de células imunes no seu parênquima – ignorância imunológica), para um conceito de “imunoespecialização” do SNC, no qual há frequentes interacções entre estes dois sistemas, baseadas em vias de migração das células imunes para dentro e fora do SNC, bem definidas, e reguladas por mediadores tais como as quimiocinas e seus receptores (284, 285). Durante o aparecimento de lesões desmielinizantes activas, as quimiocinas assumem o papel de recrutamento das células inflamatórias, através da indução de moléculas de adesão celular no endotélio vascular, e da criação de um gradiente quimiotático de migração para estas células. A migração através do endotélio, e a penetração no parênquima nervoso é facilitada através de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz, sobretudo a MMP-2 e MMP-9, cujos níveis estão aumentados no LCR de doentes com EM (286). Dentro das

quimiocinas, destacam-se os receptores CCR5 e CXCR3 para os linfócitos Th1, e os receptores CCR3 e CCR4 para os Th2; a presença do receptor CCR7 parece servir como marcador da capacidade migratória destas células. A expressão de CCR5 encontra-se aumentado nas células T nos doentes com EM e, particularmente, durante os surtos, e as células T CCR5+ e CXCR3+ produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. No LCR, são detectáveis níveis aumentados de CCL5 (RANTES) e de CXCL10 (IP-10), a presença de CCL3 (MIP-1 α) e diminuídos de CCL2 (MCP-1) nos doentes com EM, sobretudo com relação com os surtos e a detecção de actividade na RMN. Por último, nas lesões parenquimatosas, são detectáveis, entre outras, as quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES); os receptores CXCR3 e CCR5 são detectáveis na maioria dos linfócitos perivasculares, CCR1 e CCR5 nos monócitos, e CCR2 e 3 nos macrófagos (139, 287).

A complexidade da resposta imune, presente nas lesões desmielinizantes, é por demais evidente, e, embora redutor, torna-se necessário considerar separadamente cada um dos seus elementos de maneira a poder estudar o seu papel. Salientamos, uma vez mais, que a compreensão detalhada dos mecanismos envolvidos nesta resposta é devida, em grande parte, ao estudo do modelo experimental de EAE; a transposição dos dados obtidos nos modelos animais para a EM, nem sempre tem sido fácil, ou mesmo possível. De seguida, iremos brevemente descrever a participação de vários dos elementos do Sistema Imune na etiopatogénese da EM; na impossibilidade de abarcar a extensíssima literatura existente sobre o assunto, existem várias excelentes revisões deste tema, cuja consulta poderá ser útil (139, 269, 288).

Do ponto de vista imunopatológico, na EM predominam as alterações da resposta imune adaptativa, em que os principais elementos envolvidos são os linfócitos T, actuando após a apresentação de autoantígenos no contexto de moléculas do MHC, e linfócitos B capazes de produzir e segregar anticorpos auto-reactivos. Dado que a existência destes clones auto-reactivos é uma característica do repertório imune normal, presume-se que exista

uma primeira fase de sensibilização, expansão clonal e activação linfocitária, fora do SNC, provavelmente nos órgãos linfóides periféricos após contacto com algum agente patogénico (e.g. EBV) com capacidade de mimetização molecular (139, 288). Numa segunda fase, estas células migram para o parênquima encefálico e medular, onde encontram o seu antígeno cognato pela segunda vez, apresentado localmente por células apresentadoras residentes, são reactivadas e utilizam as suas capacidades efectoras para desencadear uma reacção inflamatória. Tipicamente, são produzidas moléculas associadas à reacção inflamatória, entre as quais várias quimiocinas destinadas a recrutar células para o SNC, metaloproteinases de matriz que permitem a penetração na matriz extracelular, e citocinas pró-inflamatórias (Th1) que permitem a comunicação e coordenação dos vários elementos deste ataque imune, para além de possuírem capacidades efectoras próprias. Para além destes componentes da resposta adaptativa, vários elementos do Sistema Imune Inato têm papéis importantes na resposta inflamatória da placa desmielinizante activa, tais como, entre outros, os receptores *Toll-like* (TLR), mastócitos, células NK, NKT e $\gamma\delta$ T, factores do complemento e radicais livres de oxigénio (139).

Ao longo dos últimos 50 anos, a EM tem sido considerada como uma doença autoimune mediada por linfócitos T CD4+. O protagonismo da resposta celular, em detrimento da humoral, vem, em grande parte, da incapacidade experimental de transferir EAE através de anticorpos anti-mielina, enquanto as células de gânglio linfático de animais induzidos com EAE eram um veículo eficaz de transferência adoptiva da doença (por PATERSON em 1960 (289)). Durante as décadas seguintes, fruto, também, dos avanços da Imunologia experimental que permitiram uma melhor compreensão da diversidade dos fenótipos linfocitários, o papel central da resposta linfocitária T foi sendo confirmado no modelo experimental, culminando no conceito de uma imunopatologia dominada pela resposta celular mediada por linfócitos T_{helper} CD4+ de fenótipo Th1 (290). Vários elementos apoiam, também, este conceito na EM: a presença inquestionável destas células no LCR e SNC dos doentes; um risco genético associado em

grande parte aos genes do MHC classe II HLA-DR e DQ; a susceptibilidade à EAE de modelos transgênicos humanizados possuindo estes alelos HLA-DR e DQ; a necessidade da coordenação T_{helper} para garantir a maturação da resposta CD8+, produção de anticorpos de alta afinidade, e muitos outros fenómenos da imunidade inata ou adaptativa presentes na lesão desmielinizante (139, 288). Existem numerosos estudos que demonstram a presença de linfócitos T CD4+, reactivos contra antígeno da mielina do SNC, quer nos doentes com EM, quer em controlos saudáveis, em frequências consideráveis (até 1/10000 utilizando as técnicas mais sensíveis). Uma vez que estes linfócitos parecem fazer parte do repertório imune normal, outros factores têm sido apontados de forma a explicar a sua patogenicidade, como, por exemplo, frequências de precursores mais elevadas nos doentes com EM, sinais de maior activação prévia e maior avidez para o seu antígeno cognato, ou um perfil de secreção de citocinas mais marcadamente enviesado para o fenótipo Th1 (288).

A especificidade antigénica destes linfócitos T CD4+ tem sido alvo de grande atenção, uma vez que a identificação do autoantígeno responsável pela resposta não só seria um argumento importante a favor da teoria autoimune da etiologia da EM, mas, também, por possibilitar o desenvolvimento de formas de terapia antígeno-específicas, como no caso do nosso trabalho. Até ao momento, a mielina tem-se revelado uma fonte de múltiplos autoantígenos potencialmente interessantes; uma listagem recente das moléculas implicadas na EAE e EM inclui a proteína básica de mielina (*myelin basic protein*, MBP), proteína proteolipídica (*proteolipid protein*, PLP), glicoproteína oligodendrocitária da mielina (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG), glicoproteína associada à mielina (*myelin associated glycoprotein*, MAG), fosfodiesterase dos nucleótidos cíclicos (*2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase*, CNPase), proteína básica oligodendrocítica associada à mielina (*myelin associated oligodendrocytic basic protein*, MOBP) e glicoproteína específica oligodendrocitária (*oligodendrocyte-specific glycoprotein*, OSP) (139). Outros antígenos potencialmente interessantes, e não pertencentes à mielina, incluem a

proteína α -B Cristalina, a proteína S100 β , transaldolase-H (tal-H) e as próprias imunoglobulinas; por último, outros antígenos não proteicos poderão vir a ter um papel relevante, tais como os gangliosídeos GM3 e GQ1b (139).

Ao contrário dos modelos experimentais, em que tem sido possível identificar epítomos imunodominantes para cada espécie e estirpe, no ser humano predomina uma grande variabilidade no padrão de resposta (este tema será desenvolvido em detalhe no próximo capítulo). A MBP foi a primeira proteína da mielina com capacidade antigénica a ser identificada, e acerca da qual existem mais estudos. Nos mamíferos existem 5 isoformas da MBP resultantes de *splicing* alternativo dos 11 exões no gene Golli-MBP; esta proteína encontra-se na mielina do Sistema Nervoso Central e Periférico em quantidades significativas (30-40% da mielina do SNC), onde tem funções de estabilização da estrutura compacta da mielina, e nos órgãos linfóides periféricos. É possível induzir EAE através de imunização com MBP em várias estirpes de ratinho e rato, coelho, cobaio e em primatas não-humanos; os epítomos encefalitogénicos para estas espécies encontram-se identificados desde há longa data, e existe uma correspondência entre estes e os epítomos imunodominantes no contexto dos alelos HLA-DR associados à EM (revisto em (139)). No humano, o epítomo mais dominante é a MBP83-99, que interage com a maioria das moléculas de MHC associadas à EM (HLA-DR2a (DRB5*0101) e DR2b (DRB1*1501)); um segundo epítomo importante é a MBP111-129, que se associa ao alelo HLA-DR DRB1*0401. Como veremos a seguir, vários modelos transgénicos em ratinho foram já criados, com base nos epítomos dominantes para cada espécie, e nos epítomos humanos, resultando em formas de EAE espontâneas; estes resultados confirmar a encefalitogenicidade potencial dos referidos epítomos, e a importância da resposta celular T CD4+ na etiopatogénese da neuro-inflamação (139). No modelo humanizado criado para simular a interação entre a MBP111-129 e a molécula DRB1*0401 constatou-se uma localização lesional preferencial ao tronco cerebral e cerebelo, um exemplo de correlação

entre antigénio e localização anatómica que tem sido encontrada também noutros casos (291).

A PLP é a proteína mais abundante da mielina do SNC, e foi a primeira fracção a ser identificada por FOLCH-PI e LEES (292). No ratinho, existem duas isoformas principais, a PLP e a DM20, na qual estão ausentes 35 aminoácidos, e que é expressa durante o desenvolvimento da mielina, mas também nos órgãos linfóides periféricos. A presença de DM20 no timo é relevante no processo de selecção de repertório linfocitário, uma vez que a ausência de parte da sequência da proteína completa permite a existência de elevadas frequências de linfócitos T reactivos contra o epítipo imunodominante PLP139-151. Vários outros epítopos da PLP foram identificados, sobretudo para o ratinho SJL/J (como a PLP178-191), mas, também, noutras estirpes de ratinho e no rato. No doente com EM, vários epítopos têm capacidade de ligação aos alelos HLA-DR, e induzem reactividade linfocitária; entre os mais frequentes, destacam-se a PLP104-117, PLP142-153, PLP184-199 e PLP190-209, embora outros sejam, igualmente, alvos potenciais da resposta imune. Ao contrário da MBP, o padrão de reactividade parece ser mais disperso para a PLP, apesar de continuar a haver alguma correlação entre os epítopos encefalitogénicos na EAE e na EM (revisto em (139)).

A MOG foi o terceiro antigénio-alvo a ser identificado, e possui algumas características que a tornam interessante; apesar da sua raridade, quando comparada com as duas anteriores, é específica do SNC e a sua localização na periferia da bainha de mielina torna-a susceptível de interacções com anticorpos e células do SI, e praticamente não é expressa nos órgãos linfóides periféricos (139, 293). A imunização activa com MOG induz EAE em várias estirpes de ratinho (como acima referimos, o péptido MOG35-55 induz uma forma de EAE crónica progressiva no ratinho C57BL/6), no rato e no primata não-humano *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco) (294); contrariamente aos outros dois antigénios major anteriores, a transferência de anticorpos anti-MOG tem a capacidade de agravar lesões desmielinizantes e induz vesiculação da mielina, o que confirma o seu

potencial patogénico (293). A caracterização dos epítomos imunodominantes no humano não se encontra tão desenvolvida como para a MBP, e tem focado sobretudo o domínio extracelular desta proteína (semelhante às imunoglobulinas); os determinantes MOG1-20 e MOG35-55 são responsáveis pela existência de reactividades T de alta avidéz nos doentes com EM (139, 295). Curiosamente, tal como para a MBP111-129, parece haver alguma relação entre a especificidade antigénica e a localização das lesões desmielinizantes; em estudos com ratos Brown-Norway, e num recentemente descrito modelo transgénico MOG foi descrito um predomínio de lesões na medula espinal e no nervo óptico, levando a pensar que a reactividade contra esta proteína poderia estar ligada a fenótipos do tipo neuromielite óptica (139, 296, 297)

Os dados existentes para os restantes antigénios T CD4⁺ são menos detalhados e o seu papel na EAE e EM menos seguro. A MAG é uma proteína rara (menos de 1% do proteoma da mielina) e cuja localização justaxonal e seu significado foi já acima comentada. Epítomos desta proteína são encefalitogénicos em modelos animais, com um predomínio de lesões no cerebelo, centro semioval e lobos frontais na EAE em ratos Lewis, e resposta linfocitárias T e B podem ser encontradas nos doentes com EM. A região imunodominante no humano parece situar-se na região C-terminal (MAG596-612, MAG609-626). A CNPase é relativamente mais abundante (3-4% do proteoma), e localizada à região perinuclear do oligodendrócito e ansas perinodais; apesar de ser imunogénica em animais e humanos (reactividade T de alta avidéz contra a CNPase343-373 foi confirmada nos doentes com EM) a sua encefalitogenicidade não foi ainda demonstrada. A MOBP é expressa exclusivamente nos oligodendrócitos, é encefalitogénica em ratinhos SJL/J, e pelo menos um epítomo imunodominante foi já identificado nos doentes com EM (MOBP21-39). O último destes candidatos *minor*, pertencente à mielina, é a OSP, que, na realidade, é a terceira proteína mais abundante da mielina (7% do proteoma); vários epítomos desta proteína são encefalitogénicos no ratinho SJL/J, anticorpos anti-OSP foram identificados em doentes com EM-SR, e respostas celulares T em doentes

com EM-SR e controlos normais (revistos (139)). Dos candidatos não pertencentes à mielina, apenas mencionaremos brevemente a α -B cristalina; esta proteína é um dos principais constituintes do cristalino, e foi identificado por VAN NOORT *et al.* durante um *screening* de reactividade T contra um painel de proteínas fraccionadas derivadas do SNC (298). Para além do cristalino, esta proteína tem, também, um papel como proteína de choque térmico, e é expressa por oligodendrócitos e astrócitos no SNC. Com base nestes achados, este autor propôs um modelo de EM como uma reacção de stress alterada, ao invés de uma reacção autoimune contra a mielina (299). Sendo muito interessante do ponto de vista conceptual, não foi possível, no entanto, obter uma prova convincente da encefalitogenicidade desta proteína nos modelos animais; no humano, conseguem-se detectar respostas Th1 contra os epítomos α B-C21-40 e α B-C41-60 em doentes com EM, mas também em controlos saudáveis, e anticorpos contra a α B-C fazem parte do repertório imune normal de indivíduos saudáveis (300).

Apesar da especificidade da reactividade T contra os antigénios supracitados, o conceito de degenerescência de reconhecimento, ou de reactividade cruzada, tem vindo, cada vez mais, a assumir importância para a compreensão da resposta imune celular (301). Classicamente, o reconhecimento antigénico pelos linfócitos era considerado extremamente específico, e capaz de diferenciar antigénios com base em pequenas diferenças de sequência amino-acídica; no entanto, a capacidade destas células reagirem contra múltiplos outros antigénios parece ser um fenómeno praticamente universal, consequência provável dos mecanismos de selecção positiva no timo, e baseado na avidéz do reconhecimento (139, 301). Como tal, a sensibilização primária destes clones auto-reactivos, e sua activação, poderia ser fruto do contacto com outros antigénios que não os da mielina, como proposto no modelo de mimetização molecular com agentes infecciosos. Outro conceito igualmente importante, e que será detalhado no próximo capítulo, é o da diversificação de epítomos durante o processo patológico. Neste paradigma, a imunodominância de um determinado antigénio é temporalmente restrita, uma vez que a especificidade da resposta imune se

modifica com o passar do tempo, de um epítipo “primário” para outros epítipos “secundários” dentro da mesma proteína da mielina (diversificação intramolecular) ou noutras proteínas (diversificação intermolecular). A própria destruição da mielina durante o ataque imune seria responsável pela libertação destes epítipos secundários, que seriam depois alvo de respostas imunes próprias, amplificando e perpetuando, assim, o ciclo de auto-reactividade contra a mielina (302).

Como dissemos anteriormente, a maioria dos dados apontam para um viés destas células T anti-mielina para o fenótipo Th1, ou seja, para um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como os clássicos interferão gama (IFN γ), TNF, ou interleucina-12 (IL-12), e as recentemente descritas osteopontina e o eixo IL-23/IL-17, e uma redução na secreção das citocinas IL-4, IL-10 ou TGF β (280, 303-309). O papel de cada um destes mediadores químicos tem sido investigado exaustivamente em modelos animais, inclusivé através da geração de ratinhos *knockout* (KO) e do estudo da sua resposta à EAE. Na EM, tem sido mais difícil estabelecer um papel definitivo para cada citocina, até porque, muitas vezes, os resultados obtidos são contraditórios entre si, ou com os obtidos nos modelos animais. Como exemplo, relembre-se o agravamento da EM após bloqueio do TNF, ou o agravamento da EAE nos ratinhos KO para o IFN γ , efeitos paradoxais dado o papel supostamente inflamatório destas citocinas (310). Alguns destes mediadores têm efeitos directos na patogénese das lesões desmielinizantes, como, por exemplo, o TNF, enquanto outros actuam através da activação de células efectoras como os macrófagos. Outros, ainda, influenciam o processo de diferenciação fenotípica dos linfócitos T, como a IL-12 (Th1) ou a IL-4 (Th2). Dada a existência de um antagonismo de diferenciação entre estes dois fenótipos – Th1 e Th2, em que o desenvolvimento de um impede, activamente, o do contrário –, e a importância do fenótipo Th1 na EAE e presumivelmente na EM, tem sido assumido que medidas destinadas a re-estabelecer o equilíbrio fenotípico, através da estimulação de um enviesamento Th2 seriam benéficas para o tratamento desta doença. Existem, de facto, numerosos exemplos experimentais no modelo EAE, e

exemplos terapêuticos na EM (e.g., com o tratamento com interferão beta ou acetato de glatiramer), em que o aparecimento de linfócitos T com fenótipo Th2 está associado à melhoria dos sinais clínicos da doença. A estimulação deste viés de diferenciação tem sido considerada, como tal, uma das medidas de eficácia de qualquer nova terapêutica experimental.

Contrariamente a este modelo, o papel patogénico dos linfócitos Th2 na EAE tem sido alvo de estudos recentes, que revelaram um contributo potencialmente importante deste tipo de resposta, e de elementos associados ao fenómeno alérgico. LAFAILLE *et al.*, foram os primeiros a descrever a possibilidade de transferência adoptiva de EAE para animais RAG 1-/-, ou deficientes em células T $\alpha\beta$, utilizando células Th2 anti-MBP. Neste sistema, estas células Th2 também não conferiram qualquer protecção contra a EAE obtida após transferência de células Th1 (311). Nas lesões da EAE associada à resposta Th2, foram observados numerosos mastócitos com evidência de desgranulação; estas células têm, potencialmente, grande relevância patogénica, dada a sua capacidade efectora mediada pela secreção de amins vasoactivas como a histamina, proteases e outros mediadores inflamatórios capazes de lesar oligodendrócitos e neurónios (139, 311). Mais recentemente, a possibilidade de induzir anafilaxia contra antígenos da mielina no modelo de EAE, a identificação de ARN mensageiro de várias moléculas associadas à reacção alérgica, o seu papel na patogénese da EAE e a utilização terapêutica de fármacos anti-histamínicos neste modelo tem sido alvo de estudos interessantes (83, 312-314). Curiosamente, a presença de receptores histamínicos H1 e H2 foi confirmada nos linfócitos T, e associada a fenótipos Th específicos (315), e o receptor H1 foi identificado como um locus de susceptibilidade genética para doenças autoimunes (316) salientando o papel que os mediadores químicos associados à resposta alérgica podem ter na modulação da função linfocitária (317).

O paradigma clássico Th1-Th2 foi recentemente modificado pela descoberta de novas famílias de citocinas e de fenótipos de diferenciação. Nomeadamente, foi identificado um novo fenótipo de diferenciação T

auxiliador, caracterizado pela produção de IL-17, e cuja diferenciação é promovida pelo TGF β , IL-6 e IL-23, e suprimido pela IL-27 (318, 319). Estes linfócitos Th17 têm um papel pró-inflamatório crítico em várias doenças autoimunes, alérgicas e infecciosas, e, na sua ausência, a EAE tem um curso clínico muito atenuado (320-322). Não existem, ainda, dados confirmatórios sobre a importância destas células Th17 nos doentes com EM. Neste caso, a caracterização de novos fenótipos celulares associados à resposta auto-imune permite, não só, colmatar deficiências no actual modelo-padrão, mas, sobretudo, levará ao desenvolvimento de novas formas potenciais de terapia.

Para além dos linfócitos Th, outras populações linfocitárias T têm vindo a assumir uma importância cada vez maior dentro do modelo de imunopatogénese da Esclerose Múltipla. Por exemplo, os linfócitos T CD8+ (Tc), associados à resposta citotóxica contra antígenos restritos ao MHC classe I, e classicamente responsáveis pela luta contra infecções virais, encontram-se em grande número nas lesões desmielinizantes, superando mesmo a quantidade de células CD4+ até 10 vezes, como foi descrito há mais de 20 anos por TRAUGOTT, REINHERZ e RAINE, e BOOSS *et al.* (323-325). Estas células têm uma capacidade de penetração no parênquima encefálico semelhante às CD4+ e, através das suas capacidades efectoras (e.g. grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas, expressão de ligandos para “receptores da morte” como o Fas-ligando, e TNF), são capazes de destruir todos os tipos de célula presente no parênquima nervoso (revisto (326)). Recentemente, BABBE *et al.*, utilizando técnicas de micro-manipulação e PCR de células individuais, estudaram a composição clonal e o repertório TCR destas células em lesões de EM, e concluíram que os linfócitos CD8+ revelavam sinais de expansão clonal estimulada por antígeno, ou seja, que reconheciam antígenos localmente apresentados (327). Por outro lado, foi possível, noutro estudo, identificar a presença de expansão oligoclonal de células T CD8+ no sangue e LCR de doentes com EM (328, 329). A especificidade antigénica destas células contra vários componentes da mielina (MBP, PLP, MAG, entre outros) foi já confirmada em alguns estudos (330-332). De forma a exercerem as suas funções

efectoras, os linfócitos Tc têm de reconhecer o seu antigénio cognato no contexto de uma molécula MHC classe I; apesar de estas moléculas não serem expressas constitutivamente, podem ser induzidas em todos os tipos de célula glial e em neurónios, sobretudo no contexto de uma reacção inflamatória (326). Vários estudos *in vitro* demonstraram a capacidade de oligodendrócitos e astrócitos sofrerem lise quer através da libertação de grânulos, quer por apoptose mediada por Fas/CD95; os próprios neurónios podem ser alvos do ataque Tc, sobretudo mediado por Fas/CD95, resultando, por exemplo, na destruição directa de neurites (333). Ou seja, os Tc poderão estar na base não só da desmielinização, mas, também, da perda axonal observável nas placas activas de EM. No modelo experimental de EAE, tem sido possível isolar melhor o papel dos linfócitos Tc, dada a capacidade de manipulação deste modelo. O potencial encefalitogénio destas células foi confirmado utilizando transferências adoptivas de células T CD8+ específicas para a MOG35-55, para recipientes imunodeficientes (RAG1-/-), tendo sido possível obter um fenótipo de EAE crónica, muito agressiva com extensa destruição tecidular (334); noutro trabalho, Tc reactivas contra a MBP foram capazes de induzir neuro-inflamação após transferência adoptiva sistémica para recipientes irradiados, ou após transferência directa para o SNC (335). No modelo experimental de encefalomielite murina por infecção com o vírus de THEILER (TMEV-IDD), os linfócitos Tc estão envolvidos na geração de danos axonais na medula espinal (336). No seu conjunto, todos estes resultados apontam para um papel importante dos Tc na génese da lesão inflamatória, sobretudo pelas suas capacidades efectoras (revisto em (326, 337)).

Outras populações de linfócitos T com a capacidade de regular ou suprimir a resposta imune patogénica – tolerância dominante - têm sido identificadas e caracterizadas em anos recentes, através do trabalho pioneiro de grupos como o de António COUTINHO (338). Estas células têm um papel fundamental no controle da resposta imune normal e na manutenção da tolerância imune, pelo que, presumivelmente, quaisquer alterações no seu número ou função poderiam estar relacionadas com o

aparecimento de autoimunidade. Entre estas populações reguladoras, destacam-se os linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+, os linfócitos T CD8+ Qa-1 restritos, e os linfócitos T NK CD1d+ Vα24-JαQ; outras populações linfocitárias T com potencial regulador têm sido identificadas com base no seu padrão de secreção de citocinas, como as Th2 (acima mencionadas), Th3 (produção de TGFβ) e Tr1 (produção de IL-10) (revisto em (338-344)). Os linfócitos CD4+CD25+ (Tregs) constituem cerca de 10% do repertório imune normal, e têm a capacidade de regular, de forma antígeno-específica, a função de outras células T patogénicas, quer através de contacto directo, quer por secreção de mediadores solúveis. Estes linfócitos exprimem, constitutivamente, níveis elevados de FoxP3, cujo produto – scurfina – pertence à família dos factores de transcrição *forkhead/winged-helix*. A presença desta proteína é determinante na génese das Tregs; na doença hiperimune IPEX (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*) provocada pela mutação do gene FoxP3, ocorrem conjuntamente estigmas de autoimunidade, alergia e hiperreactividade às infecções. Esta doença é um exemplo de tolerância dominante, visto que mesmo o estado de hemizigotia (mãe portadora da mutação num dos seus cromossomas X) é suficiente para garantir o controlo normal da resposta imune (344). Recentemente, foi descrito por CARAMALHO *et al.*, que esta população de células reguladoras exprime vários receptores TLR, fazendo uma ponte para a resposta imune inata e potenciando o papel regulador destas células (345). O papel supressor dos linfócitos T CD8+ foi o primeiro a ser proposto, mas rapidamente foi esquecido; mais recentemente, ressurgiu com a identificação de uma população linfocitária T CD8+ com capacidade supressora para linfócitos T CD4+ activados. Esta população é restrita ao antígeno não-clássico MHC classe Ib Qa-1 apresentando antígenos do próprio, e cuja expressão está aumentada em células T CD4+ activadas por antígeno (346). Uma última população de células reguladoras compartilha características fenotípicas com as células NK e com os linfócitos T, sendo, por isso, denominadas células NK-T; estas células têm a capacidade de regular a resposta imune contra infecções virais e tumores, e, também, de

influenciar a resposta Th1 autoimune (347). As células NK-T possuem duas características distintivas: a expressão conservada de uma cadeia alfa do TCR (V α 24J α Q) e o reconhecimento de antigénios glicolipídicos apresentados pela molécula não-clássica MHC classe I CD1d; no ratinho, o glicolípido sintético α -galactosilceramido (α -GalCer) é um ligando para as células NKT, e a estimulação destas células leva à supressão da EAE (348, 349). Ao invés da vasta literatura sobre o efeito benéfico destas populações reguladoras na EAE, existem poucos dados sobre a dinâmica destas populações reguladoras na Esclerose Múltipla: parece haver uma redução quantitativa das populações Treg e NKT nestes doentes (350-353), mas este é um campo de investigação ainda largamente por explorar.

Dentro do Sistema Nervoso, a apresentação local de antigénios é fundamental para a reactivação destas populações de linfócitos Th e Tc; no entanto, existem mecanismos de controlo rigoroso das células apresentadoras (APC, *antigen presenting cells*) residentes no SNC, de maneira a manter um ambiente anti-inflamatório (revisto em (354)). Entre estes mecanismos, tem assumido importância crescente a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), envolvida no metabolismo do triptofano, e presente na microglia após estimulação com IFN γ . A indução da IDO resulta numa diminuição deste aminoácido essencial, e, também, na geração de metabolitos intermediários – quinureninas – com capacidade supressora dos linfócitos T; recentemente, PLATTEN *et al.*, demonstraram que a utilização de um metabolito sintético do triptofano (ácido N-(3,4,-dimetoxicinamoil) antranílico - (3,4,-DAA) tinha efeitos terapêuticos benéficos na EAE (355). Como tal, esta enzima pode ser um dos principais mecanismos de *feedback* negativo, responsável pelo controlo local da reacção inflamatória. A capacidade, e a competência da apresentação de antigénio são determinantes para a activação e diferenciação dos linfócitos T; a capacidade de expressão de MHC classe II, das moléculas co-estimuladoras apropriadas (CD80, CD86, ICOS), e a secreção de citocinas como a IL-4 ou a IL-12/IL-23 são os principais factores envolvidos neste processo, e que influenciam a encefalitogenicidade final dos linfócitos T. Durante o *priming*

linfocitário inicial, nos órgãos linfóides periféricos, a presença de “sinais de perigo” associados, por exemplo, a produtos microbianos influencia, sobremaneira, o desenvolvimento deste fenótipo encefalitogénico; a detecção destes através dos receptores TLR (*Toll-Like Receptors*) é um dos mecanismos principais responsáveis por este fenómeno, e outra ponte com a imunidade inata (356). Esta família de receptores, presentes nas células apresentadoras de antígeno (e.g., células dendríticas), é responsável pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), como, por exemplo, ADN bacteriano (pela sua abundância em sequências CpG não metiladas), ARN de dupla cadeia, flagelina, ou lipopolissacárido (LPS). A sua estimulação pelo ligando apropriado (por exemplo o LPS estimula o TLR4, sequências CpG estimulam o TLR9), resulta na maturação da célula apresentadora, e frequentemente, na quebra de tolerância periférica com geração de autoimunidade. Foi demonstrado, por exemplo, que a estimulação através do TLR4 e TLR9 produz EAE na estirpe resistente B10.S (357), e que o TLR4 é necessário para o mecanismo de acção da toxina pertússica na indução de EAE (358).

Como vimos anteriormente em relação às Tc, no microambiente inflamatório existente nas placas desmielinizantes há um aumento de expressão de moléculas MHC classe I por todos os elementos da nevrógia e pelos neurónios (326). No que respeita ao MHC classe II, no entanto, as únicas células com capacidade de expressão na fase inicial da placa são os macrófagos e microglia perivasculares, bem como células dendríticas presentes nesta localização (359). Este compartimento perivascular (espaços de VIRCHOW-ROBIN, plexos coroídeos, leptomeninges), é a porta de entrada no SNC, vigiada por sentinelas fagocíticas tais como os macrófagos e células dendríticas. Dada a sua competência como APC e a sua localização estratégica, estas células têm influência crítica na apresentação antigénica a linfócitos T invasores, na sua migração intraparenquimatosa, e, eventualmente, no fenómeno de diversificação de epítomos (354). Subsequentemente, e à medida que os linfócitos penetram no parênquima, a

apresentação passa a ser feita pela microglia, que participa, também, no processo inflamatório através, por exemplo, da secreção de radicais livres de oxigénio. A astroglia, apesar de ter capacidade de expressão de moléculas de classe II, tem um papel menos seguro como APC (354). A população microglial residente (descrita por DEL RIO HORTEGA em 1939) é, provavelmente, a mais importante APC na manutenção da resposta inflamatória; esta célula de origem hematopoiética representa cerca de 10% da microglia, e tem capacidade significativa de expressão de MHC classe II e moléculas co-estimuladoras. Através da secreção de IL-23 é capaz de estimular as células T_{memória}, e induzir a produção da citocina pró-inflamatória IL-17 pelos macrófagos locais (354); a sua mobilidade dentro do parênquima nervoso parece ser fundamental para a manutenção do circuito encefalitogénico na EAE (360). KROGSGAARD *et al.*, demonstraram, recentemente, que é possível detectar a apresentação de antígenos de mielina, nomeadamente da MBP83-99, no contexto de MHC classe II por parte da microglia presente nas placas desmielinizantes de doentes com EM crónica (361).

O último elemento que iremos considerar no conjunto da resposta imune associada às lesões da EM é o linfócito B. Estas células, bem como os anticorpos por si produzidos, podem ser encontradas nas lesões desmielinizantes, sobretudo no padrão II (243). Como anteriormente mencionámos, a produção oligoclonal de imunoglobulinas no LCR é um fenómeno característico desta doença, e um auxiliar diagnóstico (revisto em (362)). É, igualmente, possível, detectar uma elevada frequência de expansões oligoclonais de linfócitos B no LCR (363, 364) e parênquima nervoso (365) em doentes com EM e nos SCI. Em qualquer dos casos, a oligoclonalidade sugere a existência de antígenos específicos indutores de proliferação clonal (366). Os linfócitos B podem influir na patogénese da lesão desmielinizante de várias formas: como APC locais, providenciando co-estímulos para as células T, mas, sobretudo, pela produção de anticorpos anti-mielina (revisto em (139, 288)). Os anticorpos podem induzir desmielinização por activação do complemento, e promovem a sua fagocitose

por opsonização seguida de interacção com os receptores Fc presentes, por exemplo, nos macrófagos locais. A especificidade antigénica dos anticorpos presentes no LCR dos doentes com EM não se encontra inteiramente esclarecida, e é objecto de intensa investigação. Uma vez que, ao contrário da resposta T, os linfócitos B não são limitados a antígenios proteicos, nem restritos a MHC, a diversidade de alvos antigénicos potenciais é, naturalmente, muito maior. Várias estratégias de rastreio em massa têm sido utilizadas na identificação de antígenios, tais como a utilização de bibliotecas de expressão de ADN complementar (ADNc), bibliotecas de expressão por fagos (*phage display*), ou bibliotecas de péptidos aleatórios (366). Dentro das reactividades descritas para a resposta B, encontram-se vários agentes infecciosos, alguns componentes da mielina e um conjunto diverso de outras moléculas ((139, 288). Ao contrário do que acontece nas infecções do SNC, associadas à presença de imunoglobulinas oligoclonais no LCR (e.g. sífilis, doença de Lyme, panencefalite esclerosante subaguda), até ao momento não tem sido possível encontrar evidências concretas do papel de qualquer agente infeccioso na EM; como discutimos acima, recentemente foram descritos dados que implicam o EBV (220). Anticorpos contra a MBP, MOG, MAG, CNPase, OSP e Nogo-A foram já descritos, bem como contra a transaldolase-H, glicosfingolípidos, sulfatídeos, os gangliosídeos GD1a e GM3, galactocerebrosídeo, cadeia leve dos neurofilamentos, o proteasoma e o ADN (revisto em (139)).

A mielina, como alvo antigénico da resposta B, é um tema com implicações naturalmente relevantes, e, recentemente, os anticorpos anti-MBP e anti-MOG têm suscitado muito interesse como eventuais marcadores de diagnóstico e prognóstico. Sobretudo estes últimos poderiam ter um papel patogénico relevante; na EAE, os anticorpos anti-MOG amplificam a desmielinização produzida por imunização com MBP (367), e estes anticorpos são detectáveis *in situ* nas lesões desmielinizantes activas da EM, associados a zonas de desmielinização e fragmentação da mielina (368). O contributo de outros antígenios, não-proteicos, nomeadamente dos lípidos constituintes da mielina, tem sido alvo de diversos estudos. Os lípidos

constituem 70% da mielina, e são alvos importantes em várias doenças infecciosas e autoimunes (e.g. lúpus eritematoso disseminado). Anticorpos anti-sulfatídeos, glicolípidos e gangliosídeos foram já identificados nos doentes com EM (369-371). Utilizando uma tecnologia de análise *multiplex* de anticorpos anti-lipídicos baseada no conceito dos *spotted arrays* de BROWN-BOTSTEIN, KANTER *et al.*, estudaram a resposta de anticorpos contra um painel alargado contendo 50 lípidos do cérebro, mielina e microbianos (incluindo gangliosídeos, sulfatídeos, cerebrosídeos e esfingomielina). Comparando o LCR de 16 doentes com EM (com formas SR e SP) e 11 controlos, foi possível identificar a presença de um padrão de reactividade distinto nos doentes, com reactividade intensa contra vários lípidos incluindo os sulfatídeos, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e lisofosfatidiletanolamina (372). Na EAE em ratinhos SJL/J, o perfil temporal de detecção de anticorpos anti-sulfatídeos, anti-cerebrosídeos e anti-asialo GM1, era coincidente com o aparecimento de sinais clínicos de paralisia; mais ainda, a co-imunização com sulfatídeo e PLP139-151, ou a transferência adoptiva de anticorpos anti-sulfatídeo, levaram a um agravamento significativo da EAE (372). Reforçando o interesse potencial dos antigénios lipídicos na EM, VILLAR *et al.*, confirmaram a presença frequente de imunoglobulinas oligoclonais anti-lipídicas no LCR de doentes com EM, sobretudo específicas para a fosfatidilcolina; a detecção de IgM oligoclonais anti-lípidos revelou ser um marcador de um curso clínico mais agressivo, tendo estes doentes mais surtos e maior incapacidade neurológica (76). No seu conjunto, estes resultados apontam para a necessidade de procurar antigénios-alvo para as doenças desmielinizantes, para além das clássicas proteínas da mielina, sobretudo quando consideramos a resposta imune humoral.

Depois da enumeração de todos estes mecanismos de patogenicidade imune, uma última palavra para chamar a atenção para outro aspecto da resposta imune, que tem suscitado interesse, a saber, o seu potencial como protectora e promotora da regeneração. Este conceito de autoimunidade neuroprotectora é baseado em várias acções potencialmente benéficas do SI,

se bem que, na maioria, falte comprovar a sua relevância na EM: por exemplo, a capacidade de eliminação de detritos das células macrofágicas, preparando o terreno para a regeneração axonal, a secreção de mediadores imunes e de neurotrofinas por parte das células do SI, capazes de estimular a sobrevivência neuronal e promover a regeneração, e o papel dos anticorpos anti-mielina como bloqueadores das proteínas inibidoras da regeneração como a MAG ou a Nogo-A (373, 374). Na prática, foi já demonstrado que linfócitos T, B e monócitos, presentes nas lesões desmielinizantes, são capazes de produzir BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) (375), e que os neurónios presentes nestas lesões exprimem o receptor gp145trkB, permitindo-lhes, assim, reagir a esta importante neurotrofina (376). Desta forma, tal como a reacção inflamatória durante o processo infeccioso serve, também, para promover a cicatrização, no contexto da reacção autoimune anti-mielina a interacção entre células do Sistema Imune e Nervoso poderia, igualmente, ter aspectos positivos, que poderiam ser, eventualmente, explorados para o desenvolvimento de novas terapêuticas (377).

6. Conclusões.

A Esclerose Múltipla é uma doença verdadeiramente complexa, sob diversos pontos de vista: clínico, patogénico, patológico e imunológico. Procurámos, ao longo deste capítulo, dar uma visão ordenada dos principais temas relacionados com a caracterização desta doença que é o objecto do nosso trabalho. Aparentemente muito heterogénea do ponto de vista clínico, a unicidade nosológica da EM fundamenta-se no aparecimento de lesões focais localizadas à substância branca profunda do Sistema Nervoso Central; nestas lesões, há evidência de perda de mielina e destruição axonal, e uma reacção inflamatória de maior ou menor exuberância. Com base em dados provenientes dos estudos anátomo-patológicos clássicos e de patologia molecular mais recentes, mas, sobretudo, no desenvolvimento de modelos experimentais de desmielinização autoimune em animais, foi sendo construído um modelo-padrão da etiopatogénese desta doença. Sofrendo

modificações e aperfeiçoamentos constantes, este modelo é, hoje em dia, aceite de forma quase consensual, e está na base do desenvolvimento de novas formas de terapia.

Neste modelo, a Esclerose Múltipla é uma doença imuno-mediada, na qual ocorre um ataque autoimune coordenado contra a mielina do SNC, resultando na destruição desta substância, e frequentemente do axónio que reveste. O despoletar desta reacção autoimune deve-se, provavelmente, à interacção de um, ou vários, agentes infecciosos com o Sistema Imune de um indivíduo geneticamente susceptível; através de mimetização molecular, a reacção imune contra esse agente infeccioso possibilita igualmente o reconhecimento erróneo de antígenos do próprio, presentes na mielina. De alguma forma, ou por falha nos mecanismos de regulação imune, ou por perpetuação subclínica da infecção, ocorre uma expansão clonal de linfócitos auto-reactivos quantitativamente significativa, e pré-estimulada, capaz de migrar para dentro do SNC onde reencontra o seu antígeno cognato e desencadeia uma reacção inflamatória.

Esta visão esquemática, necessariamente redutora, da etiopatogénese da EM, é fruto de laboriosas investigações que decorreram desde a sua descrição formal até hoje, quase 150 anos depois. De seguida, veremos como evoluíram os conceitos etiopatogénicos nesta doença ao longo deste período, descreveremos a criação do modelo experimental de EAE, e como, a partir desse modelo, se identificaram os principais antígenos da mielina, culminando na compreensão íntima, molecular, das interacções entre estes e as moléculas responsáveis pela sua apresentação e reconhecimento, ou seja, do complexo trimolecular.

7. Bibliografia.

1. Keegan BM, Noseworthy JH. 2002. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53: 285-302
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343: 938-52
3. Compston A, Coles A. 2002. Multiple sclerosis. *Lancet* 359: 1221-31
4. McKhann GM. 1982. Multiple sclerosis. *Annu Rev Neurosci* 5: 219-39
5. Hafler DA. 2004. Multiple Sclerosis. *J Clin Invest* 113: 788-94
6. Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, et al. 2005. Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204: 208-31

7. Kobelt G, Pugliati M. 2005. Costs of Multiple Sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 12: 63-7
8. Compston A, Confavreux C. 2006. The distribution of Multiple Sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al, pp. 982: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
9. Anderson DW, Ellenberg JH, Leventhal CM, et al. 1992. Revised estimate of the prevalence of multiple sclerosis in the United States. *Ann Neurol* 31: 333-6
10. De Sa J, Paulos A, Mendes H, et al. 2006. The prevalence of multiple sclerosis in the District of Santarem, Portugal. *J Neurol* 253(7):914-8.
11. Kurtzke JF. 1991. Multiple sclerosis: changing times. *Neuroepidemiology* 10: 1-8
12. McDonald I, Compston A. 2006. The symptoms and signs of Multiple Sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al, pp. 982: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
13. Hartung HP. 2005. Early treatment and dose optimisation BENEFIT and BEYOND. *J Neurol* 252 Suppl 3: iii44-iii50
14. Uitdehaag BM, Kappos L, Bauer L, et al. 2005. Discrepancies in the interpretation of clinical symptoms and signs in the diagnosis of multiple sclerosis. A proposal for standardization. *Mult Scler* 11: 227-31
15. Calabrese P. 2006. Neuropsychology of multiple sclerosis--an overview. *J Neurol* 253 Suppl 1: I10-5
16. Heesen C, Nawrath L, Reich C, et al. 2006. Fatigue in multiple sclerosis: an example of cytokine mediated sickness behaviour? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 34-9
17. Heesen C, Koehler G, Gross R, et al. 2005. Altered cytokine responses to cognitive stress in multiple sclerosis patients with fatigue. *Mult Scler* 11: 51-7
18. Brinkmeier H, Aulkemeyer P, Wollinsky KH, Rudel R. 2000. An endogenous pentapeptide acting as a sodium channel blocker in inflammatory autoimmune disorders of the central nervous system. *Nat Med* 6: 808-11
19. Smith KJ, Hall SM. 2001. Factors directly affecting impulse transmission in inflammatory demyelinating disease: recent advances in our understanding. *Curr Opin Neurol* 14: 289-98
20. Meuth SG, Budde T, Duyar H, et al. 2003. Modulation of neuronal activity by the endogenous pentapeptide QYNAD. *Eur J Neurosci* 18: 2697-706
21. Kurtzke JF. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444-52
22. Lublin FD, Reingold SC. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46: 907-11
23. Weinshenker BG. 1994. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 Suppl: S6-11
24. Confavreux C, Compston A. 2006. The natural history of multiple sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al, pp. 982: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
25. Rudick RA, Cohen JA, Weinstock-Guttman B, et al. 1997. Management of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 337: 1604-11
26. Miller D, Barkhof F, Montalban X, et al. 2005. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 4: 281-8
27. Miller D, Barkhof F, Montalban X, et al. 2005. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part 2: non-conventional MRI, recovery processes, and management. *Lancet Neurol* 4: 341-8
28. Frohman EM, Havrdova E, Lublin F, et al. 2006. Most patients with multiple sclerosis or a clinically isolated demyelinating syndrome should be treated at the time of diagnosis. *Arch Neurol* 63: 614-9
29. McAlpine D. 1961. The benign form of multiple sclerosis. A study based on 241 cases seen within three years of onset and followed up until the tenth year or more of the disease. *Brain* 84: 186-203

30. Ramsaransing GS, De Keyser J. 2006. Benign course in multiple sclerosis: a review. *Acta Neurol Scand* 113: 359-69
31. Pittock SJ, McClelland RL, Mayr WT, et al. 2004. Clinical implications of benign multiple sclerosis: a 20-year population-based follow-up study. *Ann Neurol* 56: 303-6
32. Kantarci OH, Weinshenker BG. 2005. Natural history of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23: 17-38, v
33. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, et al. 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112 (Pt 1): 133-46
34. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, et al. 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 112 (Pt 6): 1419-28
35. Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH, et al. 1991. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain* 114 (Pt 2): 1045-56
36. Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH, et al. 1991. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 4. Applications to planning and interpretation of clinical therapeutic trials. *Brain* 114 (Pt 2): 1057-67
37. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. 1999. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53: 1107-14
38. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, et al. 1992. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 671-6
39. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343: 1430-8
40. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. 2003. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 126: 770-82
41. Cottrell DA, Kremenchutzky M, Rice GP, et al. 1999. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 122 (Pt 4): 625-39
42. Cottrell DA, Kremenchutzky M, Rice GP, et al. 1999. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 6. Applications to planning and interpretation of clinical therapeutic trials in primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 122 (Pt 4): 641-7
43. Kremenchutzky M, Cottrell D, Rice G, et al. 1999. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7. Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evaluation. *Brain* 122 (Pt 10): 1941-50
44. Kremenchutzky M, Rice GP, Baskerville J, et al. 2006. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain* 129: 584-94
45. Confavreux C, Vukusic S. 2006. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 129: 606-16
46. Compston A. 2006. Making progress on the natural history of multiple sclerosis. *Brain* 129: 561-3
47. Miller D, McDonald I, Smith K. 2006. The diagnosis of multiple sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al, pp. 982: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
48. Lublin FD. 2005. Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23: 1-15, v
49. Traboulsee A, Zhao G, Li DK. 2005. Neuroimaging in multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23: 131-48, vii
50. Ge Y. 2006. Multiple Sclerosis: the role of MRI imaging. *Am J Neuroradiol* 27: 1165-76
51. Rot U, Mesec A. 2006. Clinical, MRI, CSF and electrophysiological findings in different stages of multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery* 108: 271-4

52. Thompson EJ, Freedman MS. 2006. Cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. *Advances in neurology* 98: 147-60
53. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. 2005. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Archives of neurology* 62: 865-70
54. Kabat EA, Freedman DA, Murray JP, Knaub V. 1950. A study of the crystalline albumin, gamma globulin and the total protein in the cerebrospinal fluid of one hundred cases of multiple sclerosis and other diseases. *Am J Med Sci* 219: 55-64
55. Kabat EA, Moore DH, Landow H. 1942. An electrophoretic study of the protein components in CSF and their relationship to serum proteins. *J Clin Invest* 21: 571-7
56. Kabat EA, Glusman M, Knaub V. 1948. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med* 4: 653-62
57. Sá MJ, Sequeira L, Rio ME, et al. 2003. Prevalência de bandas oligoclonais da IgG no líquido céfalo-raquidiano de doentes com Esclerose Múltipla. *Sinapse* 3: 10-6
58. Fraser CL, Klistorner A, Graham SL, et al. 2006. Multifocal visual evoked potential analysis of inflammatory or demyelinating optic neuritis. *Ophthalmology* 113: 323 e1- e2
59. Fuhr P, Kappos L. 2001. Evoked potentials for evaluation of multiple sclerosis. *Clinical neurophysiology* 112: 2185-9
60. Drislane FW. 1994. Use of evoked potentials in the diagnosis and follow-up of multiple sclerosis. *Clinical neuroscience (New York, N.Y)* 2: 196-201
61. Leocani L, Rovaris M, Martinelli Boneschi F, et al. 2006. Multimodal evoked potentials to assess the evolution of multiple sclerosis: A longitudinal study.
62. Lublin FD. 2002. The diagnosis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* 15: 253-6
63. Trojano M, Paolicelli D. 2001. The differential diagnosis of multiple sclerosis: classification and clinical features of relapsing and progressive neurological syndromes. *Neurological sciences* 22 Suppl 2: S98-102
64. Carmosino MJ, Brousseau KM, Arciniegas DB, Corboy JR. 2005. Initial evaluations for multiple sclerosis in a university multiple sclerosis center: outcomes and role of magnetic resonance imaging in referral. *Archives of neurology* 62: 585-90
65. Kappos L, Achtnichts L, Dahlke F, et al. 2005. Genomics and proteomics: role in the management of multiple sclerosis. *Journal of neurology* 252 Suppl 3: iii21-iii7
66. Masjuan J, Alvarez-Cermeno JC, Garcia-Barragan N, et al. 2006. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 66: 576-8
67. Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, et al. 2002. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology* 59: 555-9
68. Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, et al. 2003. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 53: 222-6
69. Berger T, Rubner P, Schautzer F, et al. 2003. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *The New England journal of medicine* 349: 139-45
70. Kennel De March A, De Bouwerie M, Kolopp-Sarda MN, et al. 2003. Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein B-cell responses in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 135: 117-25
71. Rauer S, Euler B, Reindl M, Berger T. 2006. Antimyelin antibodies and the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77: 739-42
72. Lim ET, Berger T, Reindl M, et al. 2005. Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 11: 492-4
73. Angelucci F, Mirabella M, Frisullo G, et al. 2005. Serum levels of anti-myelin antibodies in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during different phases of disease activity and immunomodulatory therapy. *Disease markers* 21: 49-55

74. Lampasona V, Franciotta D, Furlan R, et al. 2004. Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects. *Neurology* 62: 2092-4
75. Lalive PH, Menge T, Delarasse C, et al. 2006. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2280-5
76. Villar LM, Sadaba MC, Roldan E, et al. 2005. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of clinical investigation* 115: 187-94
77. O'Hara RM, Jr., Benoit SE, Groves CJ, Collins M. 2006. Cell-surface and cytokine biomarkers in autoimmune and inflammatory diseases. *Drug discovery today* 11: 342-7
78. Uccelli A, Pedemonte E, Narciso E, Mancardi G. 2003. Biological markers of the inflammatory phase of multiple sclerosis. *Neurological sciences* 24 Suppl 5: S271-4
79. Miller A, Glass-Marmor L, Abraham M, et al. 2004. Bio-markers of disease activity and response to therapy in multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery* 106: 249-54
80. Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C. 2005. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet neurology* 4: 32-41
81. Ibrahim SM, Gold R. 2005. Genomics, proteomics, metabolomics: what is in a word for multiple sclerosis? *Current opinion in neurology* 18: 231-5
82. Harrington CA, Rosenow C, Retief J. 2000. Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Current opinion in microbiology* 3: 285-91
83. Lock C, Hermans G, Pedotti R, et al. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine* 8: 500-8
84. Achiron A, Gurevich M, Friedman N, et al. 2004. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Annals of neurology* 55: 410-7
85. Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, et al. 2004. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* 138: 164-70
86. Weingarten P, Lutter P, Wattenberg A, et al. 2005. Application of proteomics and protein analysis for biomarker and target finding for immunotherapy. *Methods in molecular medicine* 109: 155-74
87. Finehout EJ, Franck Z, Lee KH. 2004. Towards two-dimensional electrophoresis mapping of the cerebrospinal fluid proteome from a single individual. *Electrophoresis* 25: 2564-75
88. Dumont D, Noben JP, Raus J, et al. 2004. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics* 4: 2117-24
89. Almeras L, Lefranc D, Drobecq H, et al. 2004. New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics* 4: 2184-94
90. Avasarala JR, Wall MR, Wolfe GM. 2005. A distinctive molecular signature of multiple sclerosis derived from MALDI-TOF/MS and serum proteomic pattern analysis: detection of three biomarkers. *Journal of molecular neuroscience* 25: 119-25
91. Weinshenker B. 2006. *Diagnosis: to McDonald and beyond*, American Academy of Neurology, 58th annual meeting, San Diego
92. Tselis AC, Lisak RP. 2006. Other demyelinating diseases. *Adv Neurol* 98: 335-49
93. Capello E, Mancardi GL. 2004. Marburg type and Baló's concentric sclerosis: rare and acute variants of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 25 Suppl 4: S361-3
94. Wood DD, Bilbao JM, O'Connors P, Moscarello MA. 1996. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* 40: 18-24
95. Stadelmann C, Ludwin S, Tabira T, et al. 2005. Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Baló's type of multiple sclerosis. *Brain* 128: 979-87
96. Devic E. 1894. Myelitis subaigue compliquee de neurite optique. *Bull Med* 8: 1033-4

97. Gault F. 1894. *De la neuromyelite optique aigue*. PhD thesis. Faculté de Medecine et Pharmacie, Lyon. 102 pp.
98. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. 2006. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66: 1485-9
99. Menge T, Hemmer B, Nessler S, et al. 2005. Acute disseminated encephalomyelitis: an update. *Arch Neurol* 62: 1673-80
100. Hartung HP, Grossman RI. 2001. ADEM: distinct disease or part of the MS spectrum? *Neurology* 56: 1257-60
101. Schwarz S, Mohr A, Knauth M, et al. 2001. Acute disseminated encephalomyelitis: a follow-up study of 40 adult patients. *Neurology* 56: 1313-8
102. Gusev E, Boiko A, Bikova O, et al. 2002. The natural history of early onset multiple sclerosis: comparison of data from Moscow and Vancouver. *Clin Neurol Neurosurg* 104: 203-7
103. Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, et al. 2002. Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurology* 59: 1006-10
104. Tenenbaum S, Chamoles N, Fejerman N. 2002. Acute disseminated encephalomyelitis: a long-term follow-up study of 84 pediatric patients. *Neurology* 59: 1224-31
105. Hynson JL, Kornberg AJ, Coleman LT, et al. 2001. Clinical and neuroradiologic features of acute disseminated encephalomyelitis in children. *Neurology* 56: 1308-12
106. Garg RK. 2003. Acute disseminated encephalomyelitis. *Postgrad Med J* 79: 11-7
107. Mikaeloff Y, Adamsbaum C, Husson B, et al. 2004. MRI prognostic factors for relapse after acute CNS inflammatory demyelination in childhood. *Brain* 127: 1942-7
108. Hurst EW. 1941. Acute hemorrhagic leukoencephalitis: a previously undefined entity. *Med J Aust* 2: 1-6
109. Russell DS. 1955. The nosological unity of acute haemorrhagic leukoencephalitis and acute disseminated encephalomyelitis. *Brain* 78: 369-76
110. Fontoura P, Mendes A, Correia M, Melo-Pires M. 2002. [Weston Hurst acute haemorrhagic leukoencephalitis. Neuropathological study of one case]. *Rev Neurol* 35: 328-31
111. Mizuguchi M, Abe J, Mikkaichi K, et al. 1995. Acute necrotising encephalopathy of childhood: a new syndrome presenting with multifocal, symmetric brain lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58: 555-61
112. Brinar VV. 2004. Non-MS recurrent demyelinating diseases. *Clin Neurol Neurosurg* 106: 197-210
113. Dale RC, de Sousa C, Chong WK, et al. 2000. Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. *Brain* 123 Pt 12: 2407-22
114. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Nakashima I, et al. 2006. OSMS is NMO, but not MS: proven clinically and pathologically. *Lancet Neurol* 5: 110-1
115. Misu T, Fujihara K, Nakashima I, et al. 2002. Pure optic-spinal form of multiple sclerosis in Japan. *Brain* 125: 2460-8
116. Kira J. 2003. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol* 2: 117-27
117. Osoegawa M, Niino M, Tanaka M, et al. 2005. Comparison of the clinical courses of the optico-spinal and conventional forms of multiple sclerosis in Japan. *Intern Med* 44: 934-8
118. Modi G, Mochan A, Modi M, Saffer D. 2001. Demyelinating disorder of the central nervous system occurring in black South Africans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70: 500-5
119. Compston A. 2004. 'The marvellous harmony of the nervous parts': the origins of multiple sclerosis. *Clinical medicine (London, England)* 4: 346-54
120. Compston A, Wekerle H, McDonald I. 2006. The origins of Multiple Sclerosis: a synthesis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al, pp. 982: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
121. Poser CM, Brinar VV. 2004. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. *Clinical neurology and neurosurgery* 106: 147-58

122. Allison R, Millar J. 1954. Prevalence and familial incidence of disseminated sclerosis. *Ulster Med J* 23: 1-92
123. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, et al. 1965. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 122: 552-68
124. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of neurology* 13: 227-31
125. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 50: 121-7
126. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of neurology* 58: 840-6
127. Rudick RA, Schiffer RB, Schwetz KM, Herndon RM. 1986. Multiple sclerosis. The problem of incorrect diagnosis. *Arch Neurol* 43: 578-83
128. Natowicz MR, Bejjani B. 1994. Genetic disorders that masquerade as multiple sclerosis. *Am J Med Genet* 49: 149-69
129. Paulson GW. 1996. Pseudo-multiple sclerosis. *South Med J* 89: 301-4
130. Miller D, Compston A. 2006. The differential diagnosis of multiple sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al, pp. 982: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
131. Herndon RM. 2006. Multiple sclerosis mimics. *Adv Neurol* 98: 161-6
132. Hankey GJ, Stewart-Wynne EG. 1987. Pseudo-multiple sclerosis: a clinico-epidemiological study. *Clinical and experimental neurology* 24: 11-9
133. Poser CM. 1997. Misdiagnosis of multiple sclerosis and beta-interferon. *Lancet* 349: 1916
134. Hollingworth W, Todd CJ, Bell MI, et al. 2000. The diagnostic and therapeutic impact of MRI: an observational multi-centre study. *Clinical radiology* 55: 825-31
135. Rolak LA. 2006. *Multiple Sclerosis differential diagnosis*, American Academy of Neurology, 58th annual meeting, San Diego
136. Fleming JO. 2006. *Multiple Sclerosis diagnosis*, American Academy of Neurology, 58th annual meeting, San Diego
137. Steinman L. 2001. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nature immunology* 2: 762-4
138. Inglese M. 2006. Multiple sclerosis: new insights and trends. *Ajnr* 27: 954-7
139. Sospedra M, Martin R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology* 23: 683-747
140. Ffrench-Constant C. 1994. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Lancet* 343: 271-5
141. Hafler DA. 2004. Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 113: 788-94
142. Bradl M, Hohlfeld R. 2003. Molecular pathogenesis of neuroinflammation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1364-70
143. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine* 354: 942-55
144. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature reviews* 3: 291-301
145. Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W. 2005. The pathology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23: 77-105, vi
146. Frohman EM, Filippi M, Stuve O, et al. 2005. Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions. *Archives of neurology* 62: 1345-56
147. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. 2006. Insights into the molecular pathogenesis of progression in multiple sclerosis: potential implications for future therapies. *Archives of neurology* 63: 25-33
148. Prat A, Antel J. 2005. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* 18: 225-30
149. Steinman L. 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85: 299-302

150. Weiner HL. 1998. A 21 point unifying hypothesis on the etiology and treatment of multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences* 25: 93-101
151. Steinman L. 2003. Optic neuritis, a new variant of experimental encephalomyelitis, a durable model for all seasons, now in its seventieth year. *The Journal of experimental medicine* 197: 1065-71
152. Steinman L. 1999. Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* 24: 511-4
153. Steinman L, Zamvil SS. 2005. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends in immunology* 26: 565-71
154. Encinas JA, Weiner HL, Kuchroo VK. 1996. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research* 45: 655-69
155. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet neurology* 3: 104-10
156. Oksenberg JR, Hauser SL. 2005. Genetics of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23: 61-75, vi
157. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. 1995. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377: 150-1
158. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, et al. 1996. A full genome search in multiple sclerosis. *Nature genetics* 13: 472-6
159. Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, et al. 1996. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nature genetics* 13: 469-71
160. Sawcer S, Jones HB, Feakes R, et al. 1996. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nature genetics* 13: 464-8
161. 2001. A meta-analysis of genomic screens in multiple sclerosis. The Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 7: 3-11
162. Sawcer S, Compston A. 2003. The genetic analysis of multiple sclerosis in Europeans: concepts and design. *Journal of neuroimmunology* 143: 13-6
163. 2003. A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 143: 39-46
164. Martins Silva B, Thorlacius T, Benediktsson K, et al. 2003. A whole genome association study in multiple sclerosis patients from north Portugal. *Journal of neuroimmunology* 143: 116-9
165. Santos M, Pinto-Basto J, Rio ME, et al. 2003. A whole genome screen for association with multiple sclerosis in Portuguese patients. *Journal of neuroimmunology* 143: 112-5
166. Sawcer S, Ban M, Maranian M, et al. 2005. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *American journal of human genetics* 77: 454-67
167. Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, et al. 2000. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nature genetics* 26: 495-9
168. Do HT, Baars W, Borns K, et al. 2006. The 77C->G mutation in the human CD45 (PTPRC) gene leads to increased intensity of TCR signaling in T cell lines from healthy individuals and patients with multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 176: 931-8
169. Vyshkina T, Leist TP, Shugart YY, Kalman B. 2004. CD45 (PTPRC) as a candidate gene in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 10: 614-7
170. Cocco E, Murru MR, Melis C, et al. 2004. PTPRC (CD45) C77G mutation does not contribute to multiple sclerosis susceptibility in Sardinian patients. *Journal of neurology* 251: 1085-8
171. Gomez-Lira M, Liguori M, Magnani C, et al. 2003. CD45 and multiple sclerosis: the exon 4 C77G polymorphism (additional studies and meta-analysis) and new markers. *Journal of neuroimmunology* 140: 216-21
172. Nicholas RS, Partridge J, Donn RP, et al. 2003. The role of the PTPRC (CD45) mutation in the development of multiple sclerosis in the North West region of the United Kingdom. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74: 944-5

173. Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, et al. 1998. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Human molecular genetics* 7: 1229-34
174. Hillert J, Olerup O. 1993. HLA and MS. *Neurology* 43: 2426-7
175. Paty DW, Mervart H, Campling B, et al. 1974. HL-A frequencies in patients with multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences* 1: 211-3
176. Jersild C, Ammitzboll T, Clausen J, Fog T. 1973. Association between HL-A antigens and measles antibody in multiple sclerosis. *Lancet* 1: 151-2
177. Jersild C, Svejgaard A, Fog T, Ammitzboll T. 1973. HL-A antigens and diseases. I. Multiple sclerosis. *Tissue antigens* 3: 243-50
178. Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. 1972. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue antigens* 2: 1-4
179. Marrosu MG, Murru MR, Costa G, et al. 1997. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *American journal of human genetics* 61: 454-7
180. Marrosu MG, Murru R, Murru MR, et al. 2001. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Human molecular genetics* 10: 2907-16
181. Martins da Silva A, Pereira C, Bettencourt A, et al. 2004. HLA-DRB1*15 como potencial factor de prognóstico de benignidade na Esclerose Múltipla. *Sinapse* 4: 104
182. Pereira C, Martins da Silva A, Bettencourt A, et al. 2004. Factores de susceptibilidade genéticos em doentes HLA-DRB1*15 negativos com Esclerose Múltipla. *Sinapse* 4: 104
183. Rio ME, Lima B, Tafulo S, et al. 2006. HLA allele association and Multiple Sclerosis in Portuguese patients [abstract]. *Multiple Sclerosis* 12 (Suppl 1)
184. Kesselring J. 1997. Epidemiology. In *Multiple Sclerosis*, ed. J Kesselring, pp. 214. Cambridge: Cambridge University Press
185. Schaub B, Lauener R, von Mutius E. 2006. The many faces of the hygiene hypothesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117: 969-77; quiz 78
186. Christen U, von Herrath MG. 2005. Infections and autoimmunity--good or bad? *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 174: 7481-6
187. Bach JF. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine* 347: 911-20
188. Bach JF. 2005. Infections and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 25 Suppl: 74-80
189. Sibley WA, Bamford CR, Clark K. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1: 1313-5
190. Kurtzke JF, Hyllested K. 1975. Multiple sclerosis: an epidemic disease in the Faeroes. *Transactions of the American Neurological Association* 100: 213-5
191. Kurtzke JF, Hyllested K. 1978. Multiple sclerosis in the Faroes: 1. Clinical and epidemiologic features. *Transactions of the American Neurological Association* 103: 201-5
192. Kurtzke JF, Hyllested K. 1979. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: I. Clinical and epidemiological features. *Annals of neurology* 5: 6-21
193. Kurtzke JF, Hyllested K. 1986. Multiple sclerosis in the Faroe Islands. II. Clinical update, transmission, and the nature of MS. *Neurology* 36: 307-28
194. Kurtzke JF, Hyllested K. 1987. MS epidemiology in Faroe Islands. *Rivista di neurologia* 57: 77-87
195. Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A, Olsen A. 1993. Multiple sclerosis in the Faroe Islands. 5. The occurrence of the fourth epidemic as validation of transmission. *Acta neurologica Scandinavica* 88: 161-73
196. Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A. 1995. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: transmission across four epidemics. *Acta neurologica Scandinavica* 91: 321-5
197. Gilden DH. 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet neurology* 4: 195-202
198. Granieri E, Casetta I, Tola MR, Ferrante P. 2001. Multiple sclerosis: infectious hypothesis. *Neurological sciences* 22: 179-85

199. Marie P. 1884. Sclerose en plaques et maladies infectueuses. *Prog Med* 12: 287-9
200. Cook SD. 1998. Multiple Sclerosis. *Arch Neurol* 55: 421-3
201. Murray J. 2006. Infection as a cause of multiple sclerosis. *British Medical Journal* 325: 1128
202. Casetta I, Granieri E. 2000. Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology. *Journal of neurovirology* 6 Suppl 2: S147-51
203. Greenberg SJ. 1995. Human retroviruses and demyelinating diseases. *Neurologic clinics* 13: 75-97
204. Perron H, Garson JA, Bedin F, et al. 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7583-8
205. Dolei A, Serra C, Mameli G, et al. 2002. Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology* 58: 471-3
206. Christensen T. 2005. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Reviews in medical virology* 15: 179-211
207. Clausen J. 2003. Endogenous retroviruses and MS: using ERVs as disease markers. *International MS journal / MS Forum* 10: 22-8
208. Simmons A. 2001. Herpesvirus and multiple sclerosis. *Herpes* 8: 60-3
209. McHatters GR, Scham RG. 1995. Bird viruses in multiple sclerosis: combination of viruses or Marek's alone? *Neuroscience letters* 188: 75-6
210. Bougiouklis PA. 2006. Suggesting the possible role of Turkey Herpesvirus or HVT-like as a predisposing factor or causative agent in multiple sclerosis.
211. Zerr DM, Meier AS, Selke SS, et al. 2005. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *The New England journal of medicine* 352: 768-76
212. Ward KN, Andrews NJ, Verity CM, et al. 2005. Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Archives of disease in childhood* 90: 619-23
213. Ward KN. 2005. Human herpesviruses-6 and -7 infections. *Current opinion in infectious diseases* 18: 247-52
214. Clark D. 2004. Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes* 11 Suppl 2: 112A-9A
215. Alonso A, Egues Olazabal N, Ayo Martin O. 2006. [Infection by Epstein-Barr virus and multiple sclerosis.]. *Neurologia (Barcelona, Spain)* 21: 249-55
216. Cook SD. 2004. Does epstein-barr virus cause multiple sclerosis? *Reviews in neurological diseases* 1: 115-23
217. Francisci D, Sensini A, Fratini D, et al. 2004. Acute fatal necrotizing hemorrhagic encephalitis caused by Epstein-Barr virus in a young adult immunocompetent man. *Journal of neurovirology* 10: 414-7
218. Hofer M, Weber A, Haffner K, et al. 2005. Acute hemorrhagic leukoencephalitis (Hurst's disease) linked to Epstein-Barr virus infection. *Acta neuropathologica* 109: 226-30
219. Fujimoto H, Asaoka K, Imaizumi T, et al. 2003. Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 42: 33-40
220. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, et al. 2005. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 115: 1352-60
221. Ascherio A, Munch M. 2000. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 11: 220-4
222. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. 2006. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Annals of neurology* 59: 499-503
223. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, et al. 2006. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Archives of neurology* 63: 839-44
224. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, et al. 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nature immunology* 3: 940-3

225. Holmoy T, Kvale EO, Vartdal F. 2004. Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *Journal of neurovirology* 10: 278-83
226. Holmoy T, Vartdal F. 2004. Cerebrospinal fluid T cells from multiple sclerosis patients recognize autologous Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Journal of neurovirology* 10: 52-6
227. Hollsberg P, Hansen HJ, Haahr S. 2003. Altered CD8+ T cell responses to selected Epstein-Barr virus immunodominant epitopes in patients with multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology* 132: 137-43
228. Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Hollsberg P. 2004. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica* 109: 270-5
229. Lovett-Racke AE, Racke MK. 2006. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Archives of neurology* 63: 810-1
230. Compston A. 1999. *The story of Multiple Sclerosis*. London: Churchill Livingstone
231. Charcot J-M. 1868. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette Hospital (Paris)* 41: 554-66
232. Babinski J. 1885. *Etude anatomique et clinique sur la sclérose en plaques*. Paris: Masson
233. Lassmann H, Wekerle H. 2006. The pathology of multiple sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al, pp. 982: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
234. Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W. 2005. The pathology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23: 77-105, vi
235. Ludwin SK. 2006. The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 305-18
236. Bruck W, Stadelmann C. 2005. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol* 18: 221-4
237. Barnett MH, Sutton I. 2006. The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Curr Opin Neurol* 19: 242-7
238. Lucchinetti C, Bruck W, Noseworthy J. 2001. Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment. *Current opinion in neurology* 14: 259-69
239. Bo L, Geurts JJ, Ravid R, Barkhof F. 2004. Magnetic resonance imaging as a tool to examine the neuropathology of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30: 106-17
240. Steinman L, Zamvil S. 2003. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 3: 483-92
241. Barnett MH, Henderson AP, Prineas JW. 2006. The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 12: 121-32
242. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine* 7: 115-21
243. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, et al. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 47: 707-17
244. Lucchinetti C, Bruck W. 2004. The pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 10 Suppl 1: S23-30
245. Pittock SJ, McClelland RL, Achenbach SJ, et al. 2005. Clinical course, pathological correlations, and outcome of biopsy proved inflammatory demyelinating disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 76: 1693-7
246. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, et al. 2002. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125: 1450-61
247. Keegan M, König F, McClelland R, et al. 2005. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 366: 579-82
248. Barnett MH, Prineas JW. 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of neurology* 55: 458-68

249. Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, et al. 2001. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Annals of neurology* 50: 646-57
250. Bo L, Vedeler CA, Nyland HI, et al. 2003. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62: 723-32
251. Bo L, Vedeler CA, Nyland H, et al. 2003. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 9: 323-31
252. De Stefano N, Narayanan S, Francis SJ, et al. 2002. Diffuse axonal and tissue injury in patients with multiple sclerosis with low cerebral lesion load and no disability. *Archives of neurology* 59: 1565-71
253. Filippi M, Rocca MA. 2005. MRI evidence for multiple sclerosis as a diffuse disease of the central nervous system. *Journal of neurology* 252 Suppl 5: v16-24
254. Evangelou N, Esiri MM, Smith S, et al. 2000. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 47: 391-5
255. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128: 2705-12
256. Peterson JW, Trapp BD. 2005. Neuropathobiology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23: 107-29, vi-vii
257. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 338: 278-85
258. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3): 393-9
259. Lassmann H. 2003. Axonal injury in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74: 695-7
260. Filbin MT. 2003. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4: 703-13
261. Fontoura P, Steinman L. 2006. Nogo in multiple sclerosis: growing roles of a growth inhibitor. *Journal of the neurological sciences* 245: 201-10
262. Dubois-Dalcq M, Ffrench-Constant C, Franklin RJ. 2005. Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis. *Neuron* 48: 9-12
263. Zamvil SS, Steinman L. 2003. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 38: 685-8
264. Wolswijk G. 2002. Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 125: 338-49
265. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD. 2002. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 346: 165-73
266. Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, et al. 2004. bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* 306: 2111-5
267. John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, et al. 2002. Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nature medicine* 8: 1115-21
268. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annual review of immunology* 10: 153-87
269. Bar-Or A. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23: 149-75, vii
270. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. 1987. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1: 893-5
271. Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. 1987. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37: 1097-102
272. 1999. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 53: 457-65
273. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, et al. 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nature medicine* 6: 1167-75

274. Roach ES. 2004. Is multiple sclerosis an autoimmune disorder? *Archives of neurology* 61: 1615-6
275. Weiner HL. 2004. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Archives of neurology* 61: 1613-5
276. Chaudhuri A, Behan PO. 2004. Multiple sclerosis is not an autoimmune disease. *Archives of neurology* 61: 1610-2
277. Smith HR, Steinberg AD. 1983. Autoimmunity--a perspective. *Annual review of immunology* 1: 175-210
278. Anderton SM, Wraith DC. 2002. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nature reviews* 2: 487-98
279. von Herrath MG, Harrison LC. 2003. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nature reviews* 3: 223-32
280. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nature reviews* 2: 37-45
281. Steinman L. 1995. Escape from "horror autotoxicus": pathogenesis and treatment of autoimmune disease. *Cell* 80: 7-10
282. Rose NR, Bona C. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology today* 14: 426-30
283. Witebsky E, Rose NR, Terplan K, et al. 1957. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *Journal of the American Medical Association* 164: 1439-47
284. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews* 3: 569-81
285. Charo IF, Ransohoff RM. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine* 354: 610-21
286. Rosenberg GA. 2002. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39: 279-91
287. Trebst C, Ransohoff RM. 2001. Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges. *Archives of neurology* 58: 1975-80
288. Wekerle H, Lassmann H. 2006. The immunology of inflammatory demyelinating disease. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*, ed. A Compston, C Confavreux, H Lassmann, et al: Churchill Livingstone Elsevier Inc.
289. Paterson PY. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *The Journal of experimental medicine* 111: 119-36
290. Zamvil SS, Steinman L. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual review of immunology* 8: 579-621
291. Quandt JA, Baig M, Yao K, et al. 2004. Unique clinical and pathological features in HLA-DRB1*0401-restricted MBP 111-129-specific humanized TCR transgenic mice. *J Exp Med* 200: 223-34
292. Folch J, Lees M. 1951. Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J Biol Chem* 191: 807-17
293. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, et al. 1997. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75: 77-88
294. Genain CP, Hauser SL. 1997. Creation of a model for multiple sclerosis in Callithrix jacchus marmosets. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 75: 187-97
295. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, et al. 2004. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172: 3893-904
296. Storch MK, Stefferl A, Brehm U, et al. 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8: 681-94
297. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, et al. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197: 1073-81
298. van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, et al. 1995. The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 375: 798-801

299. van Noort JM. 1996. Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 74: 285-96
300. van Noort JM, Verbeek R, Meilof JF, et al. 2006. Autoantibodies against alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis, are part of a normal human immune repertoire. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 12: 287-93
301. Wucherpfennig KW. 2004. T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition. *Mol Immunol* 40: 1009-17
302. Vanderlugt CL, Miller SD. 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2: 85-95
303. Crane IJ, Forrester JV. 2005. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Critical reviews in immunology* 25: 75-102
304. Bielekova B, Martin R. 2004. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 127: 1463-78
305. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294: 1731-5
306. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744-8
307. Iwakura Y, Ishigame H. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of clinical investigation* 116: 1218-22
308. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201: 233-40
309. Park H, Li Z, Yang XO, et al. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6: 1133-41
310. Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. 2000. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 192: 123-8
311. Lafaille JJ, Keere FV, Hsu AL, et al. 1997. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *The Journal of experimental medicine* 186: 307-12
312. Pedotti R, Mitchell D, Wedemeyer J, et al. 2001. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nature immunology* 2: 216-22
313. Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, et al. 2003. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1867-72
314. Pedotti R, De Voss JJ, Steinman L, Galli SJ. 2003. Involvement of both 'allergic' and 'autoimmune' mechanisms in EAE, MS and other autoimmune diseases. *Trends in immunology* 24: 479-84
315. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, et al. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413: 420-5
316. Ma RZ, Gao J, Meeker ND, et al. 2002. Identification of Bphs, an autoimmune disease locus, as histamine receptor H1. *Science* 297: 620-3
317. Jutel M, Blaser K, Akdis CA. 2005. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *International archives of allergy and immunology* 137: 82-92
318. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-52
319. Steinman L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13: 139-45
320. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177: 566-73

321. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201: 233-40
322. Batten M, Li J, Yi S, et al. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7: 929-36
323. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. 1983. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science* 219: 308-10
324. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. 1983. Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *Journal of neuroimmunology* 4: 201-21
325. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. 1983. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 62: 219-32
326. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in neurosciences* 25: 313-9
327. Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. 2000. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine* 192: 393-404
328. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, et al. 2002. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 125: 538-50
329. Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, et al. 2004. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2428-33
330. Tsuchida T, Parker KC, Turner RV, et al. 1994. Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10859-63
331. Honma K, Parker KC, Becker KG, et al. 1997. Identification of an epitope derived from human proteolipid protein that can induce autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-A3: evidence for cross-reactivity with an environmental microorganism. *Journal of neuroimmunology* 73: 7-14
332. Zang YC, Li S, Rivera VM, et al. 2004. Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.* 172: 5120-7
333. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. 2001. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *The American journal of pathology* 159: 809-15
334. Sun D, Whitaker JN, Huang Z, et al. 2001. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.* 166: 7579-87
335. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, et al. 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 194: 669-76
336. Murray PD, Pavelko KD, Leibowitz J, et al. 1998. CD4(+) and CD8(+) T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *Journal of virology* 72: 7320-9
337. Steinman L. 2001. Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 194: F27-30
338. Coutinho A, Hori S, Carvalho T, et al. 2001. Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and "quality control" of immune responses. *Immunological reviews* 182: 89-98
339. Jiang H, Chess L. 2004. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *The Journal of clinical investigation* 114: 1198-208
340. Maloy KJ, Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology* 2: 816-22

341. Shevach EM. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annual review of immunology* 18: 423-49
342. Schwartz RH. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature immunology* 6: 327-30
343. Fehervari Z, Sakaguchi S. 2004. CD4+ Tregs and immune control. *The Journal of clinical investigation* 114: 1209-17
344. Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology* 22: 531-62
345. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 197: 403-11
346. Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. 2004. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *The Journal of clinical investigation* 114: 1218-21
347. Kronenberg M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual review of immunology* 23: 877-900
348. Singh AK, Wilson MT, Hong S, et al. 2001. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 194: 1801-11
349. Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, et al. 2001. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 194: 1789-99
350. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 199: 971-9
351. Illes Z, Kondo T, Newcombe J, et al. 2000. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 164: 4375-81
352. van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, et al. 2001. Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 100: 144-8
353. Gausling R, Trollmo C, Hafler DA. 2001. Decreases in interleukin-4 secretion by invariant CD4(-)CD8(-)V alpha 24J alpha Q T cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 98: 11-7
354. Becher B, Bechmann I, Greter M. 2006. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 84: 532-43
355. Platten M, Ho PP, Youssef S, et al. 2005. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* 310: 850-5
356. Kielian T. 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of neuroscience research* 83: 711-30
357. Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. 2004. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *The Journal of clinical investigation* 113: 990-7
358. Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, et al. 2004. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 173: 7070-7
359. Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M. 1992. Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology* 76: 209-16
360. Heppner FL, Greter M, Marino D, et al. 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature medicine* 11: 146-52
361. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, et al. 2000. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal

- antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* 191: 1395-412
362. Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. 2002. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *Journal of neurology* 249: 375-89
363. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, et al. 1998. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 102: 1045-50
364. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, et al. 2003. Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83: 1081-8
365. Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, et al. 1999. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *Journal of immunology (Baltimore, Md.* 163: 5133-44
366. Gilden DH, Burgoon MP, Kleinschmidt-DeMasters BK, et al. 2001. Molecular immunologic strategies to identify antigens and b-cell responses unique to multiple sclerosis. *Archives of neurology* 58: 43-8
367. Linington C, Bradl M, Lassmann H, et al. 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *The American journal of pathology* 130: 443-54
368. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature medicine* 5: 170-5
369. Ilyas AA, Chen ZW, Cook SD. 2003. Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 139: 76-80
370. Shamshiev A, Donda A, Carena I, et al. 1999. Self glycolipids as T-cell autoantigens. *European journal of immunology* 29: 1667-75
371. Sadatipour BT, Greer JM, Pender MP. 1998. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Annals of neurology* 44: 980-3
372. Kanter JL, Narayana S, Ho PP, et al. 2006. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature medicine* 12: 138-43
373. Schwartz M, Kipnis J. 2005. Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. *Journal of the neurological sciences* 233: 163-6
374. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, et al. 2006. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurological sciences* 27 Suppl 1: S1-7
375. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, et al. 1999. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *The Journal of experimental medicine* 189: 865-70
376. Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, et al. 2002. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125: 75-85
377. Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, et al. 2003. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Annals of neurology* 53: 292-304

CAPÍTULO II

**Evolução dos Conceitos Etiopatogénicos
na Esclerose Múltipla e o Desenvolvimento dos
Modelos Animais de Doença Desmielinizante.**

1. A definição nosológica da Esclerose Múltipla. Breves notas históricas sobre as primeiras descrições da doença, sua definição e evolução dos conceitos etiopatogénicos iniciais.

Ao longo de todo o século XIX, a Neurologia sofreu um desenvolvimento notável, emergindo do seio da medicina clínica com uma ciência e uma linguagem próprias, e tomando para si um vasto grupo de patologias até então dispersas sob as mais variadas denominações. De facto, durante este período, a multiplicidade de entidades clínicas, com manifestações variadas, de difícil definição e diagnóstico ainda mais problemático, foi dando lugar, através do esforço persistente dos investigadores, a uma classificação baseada numa taxonomia clínica baseada nas disciplinas da Neuroanatomia, Anatomia Patológica, Histologia e, sobretudo, no método clínico-anatómico. Foram, assim, definidas a grande maioria das patologias que, ainda hoje, preenchem a prática clínica dos neurologistas, e ocupam os cientistas dedicados a este ramo da Ciência Médica^f.

Nesse contexto, a Esclerose Múltipla foi estabelecida, enquanto entidade nosológica clinicamente autónoma, durante o século XIX, com os vários trabalhos de CRUVEILHIER (1835) (1), CARSWELL (1838) (2), FRERICHS (1849) (3), ROKITANSKY (1857) e RINDFLEISCH (1863) (4, 5), e, sobretudo, com os estudos seminais de CHARCOT e VULPIAN (1866 e 1868) (6-13). CARSWELL e CRUVEILHIER são os primeiros a descrever, quase simultaneamente, a existência de lesões endurecidas, esclerosadas, na medula espinhal de doentes com quadros clínicos que são compatíveis com o diagnóstico actual de Esclerose Múltipla. Ambos os autores baseiam as suas descrições em casos clínicos observados em Paris, nos hospitais *La Pitié* e *La Charité*, onde o método clínico-anatómico de correlação dos dados clínicos

^f Citando FERREIRA DE MOURA (1872), sobre os desafios da prática neurológica: “Diante d’esse sem numero de indivíduos, que, de ambos os sexos, de todas as idades, e de todas as condições sociaes recorrem diariamente a nós, apresentando tão variadas manifestações d’essas doenças, que constituem o grande grupo das *neuroses*; em presença da originalidade dos symptomas e marcha d’essas moléstias, e da sua ordinaria rebeldia ao tratamento, luta-se a todo o momento em vão para dar certa precisão ao diagnostico; luta-se até ao desespero para dar um allivio aos desgraçados, que se acercam de nós” (17).

com as lesões observáveis em autópsia estava a dar os seus primeiros frutos (10). Friedrich VON FRERICHS, no seu trabalho “Über Hirnsclerose” (1849), e o seu discípulo VALENTINER (14), ao contrário dos seus predecessores, não se restringem, apenas, à descrição de lesões medulares, mas dedicam-se, sobretudo, à correlação da existência de múltiplas lesões escleróticas encefálicas em doentes com cursos clínicos de evolução por surtos e remissões, a forma clínica de Esclerose Múltipla ainda hoje mais comum.

No seguimento dos trabalhos de VIRCHOW sobre a “degeneração cinzenta” (correspondendo, provavelmente, a lesões esclero-glióticas), Eduard RINDFLEISCH (5) demonstra a existência, no centro da placa esclerótica, de vasos sanguíneos dilatados com espessamento da parede, o que o leva a pensar que a lesão inflamatória vascular precede a destruição da mielina e proliferação glial (10). O que diferencia os trabalhos de Jean-Martin CHARCOT e Edmé VULPIAN dos antecedentes, como se pode constatar, não é meramente a redescoberta da existência de lesões escleróticas disseminadas pelo Sistema Nervoso Central, nem a sua caracterização anatomo-patológica, uma vez que esse trabalho tinha sido feito, exaustivamente, pelos patologistas alemães clássicos que os precederam. O mérito destes autores, e o motivo pelo qual historicamente se atribui a CHARCOT a definição desta entidade clínica, consiste na abordagem holística que fazem da doença, não só nos seus aspectos macro e micro-patológicos, mas, sobretudo, na observação prolongada de vários doentes portadores desta “nova” entidade clínica, com a definição dos subtipos espinal, cefálica e cérebro-espinal, da tríade clínica nistagmo-tremor intencional-voz escândida (tríade de CHARCOT, sem a qual o diagnóstico de EM era questionado pelos neurologistas de tradição francófona até pelo menos meados do século XX (15)^f), e da diferenciação

^f A este propósito, citamos ALMEIDA LIMA “A neurologia entre nós foi profundamente devedora da cultura francesa [...] e o respeito à autoridade de Charcot levava a hesitar no diagnóstico dos casos nos quais não se revelava a tríada clássica: tremor intencional, nistagmo e voz escândida. Os neurologistas de outros países, mais libertos de respeito aos clássicos franceses, são menos exigentes no diagnóstico da Esclerose em Placas e por isso afirmam-no muito mais vezes” (15).

com outras doenças com manifestações fenomenológicas semelhantes, como a *paralysis agitans* (Doença de Parkinson), coreia, e paralisia geral (neurosífilis) (10). Como se pode constatar, o acumular sequencial de dados provenientes das técnicas histopatológicas, conjuntamente com uma cultura clínica que privilegiava a definição de entidades patológicas diferenciadas, e o apuramento do conceito de unicidade clínico-patológica-anatômica para as doenças, levou à autonomização da Esclerose Múltipla como doença (7, 10, 11). No seu conjunto, todos estes trabalhos definiram uma entidade patológica apoiada numa unidade clínico-anatômica, i.e., um conjunto de sinais e sintomas neurológicos motivados pelo mesmo mecanismo patogénico, neste caso caracterizado pela presença de cicatrizes glióticas dispersas pela substância branca encefálica e medular, infiltrados inflamatórios dispersos e abundante destruição axonal (11)[∞]. Dada a abundância e disseminação das cicatrizes glióticas, a doença foi denominada de Esclerose em Placas (*sclérose en plaques*), ou Esclerose Disseminada (*disseminated sclerosis*), pelas escolas neurológicas francesa e inglesa, respectivamente. O próprio CHARCOT utilizou quatro termos diferentes para a designar: *sclérose en plaques*, *sclérose en ilots*, *sclérose multiloculaire* e *sclérose disseminée*, referindo-se os primeiros dois termos à aparência das lesões, e os dois últimos à sua distribuição pelo Sistema Nervoso, sendo a sua denominação preferida a primeira (10). Só mais tarde, com a progressiva importância da neurológica norte-americana, o termo Esclerose Múltipla (*Multiple Sclerosis*), inicialmente privilegiado pela escola de neurologia alemã[°], passou a ser utilizado correntemente, e é, hoje, a designação predominante internacionalmente (16).

[∞] Existem vários trabalhos extensivos sobre a história desta doença e que, naturalmente, excedem largamente o âmbito desta tese. Para uma revisão recente do tema, aconselhamos o livro *Multiple Sclerosis: the history of a disease* de Jock T. Murray (11).

[°] Por mera curiosidade, citamos os títulos de trabalhos de importantes neurologistas germânicos contemporâneos com o estabelecimento desta entidade clínica, nos quais se utiliza a designação alemã *Multiple Sklerose*: Westphal, C. “Über Multiple Sklerosen bei zwei Knaben” *Charité-Annalen* 1888; 13: 459-70; Uhthoff, W. “Untersuchungen über die bei der Multiplen Herdsklerose vorkommenden Augenstörungen” *Archiv des Psychiatrie und Nervenkrankheit* 1890; 21: 55-116; Schüle, W. “Beitrag zur Multiplen Sklerose des Gehirns und Rückenmarks” *Deutsches Archiv für klinischer Medizin* 1870; 7: 259; Pelizaeus, F. “Über eine eigentümliche Form spastischer Lähmung mit cerebraler scheinnungen auf hereditärer Grundlage (multiple sklerose)” *Archiv des Psychiatrie und Nervenkrankheit*

No final deste século de emancipação da Neurologia, as ciências neurológicas em Portugal davam os seus primeiros passos, apesar de não existir, na altura em que se define esta entidade clínica, qualquer centro nacional dedicado ao estudo e investigação nesta área. No entanto, isto não quer dizer que os clínicos portugueses tivessem ficado à margem dos avanços que as escolas francesa, alemã e inglesa protagonizavam, e que, consequentemente, estivessem isolados do “mainstream” das ciências biomédicas europeias. De facto, provavelmente o primeiro trabalho de autoria portuguesa sobre esta doença surge logo em 1872, numa extensa comunicação à Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa por Vicente FERREIRA DE MOURA (17). Este trabalho é notável pela sua erudição e revisão bibliográfica (encontrando-se o autor perfeitamente inteirado dos trabalhos de CRUVEILHIER, CARSWELL, TURCK, ROKITANSKY, FRERICHS, VALENTINER, RINDFLEISCH, BOUCHARD, VULPIAN, CHARCOT e BOURNEVILLE), pela extensa revisão e explanação que faz do tema em questão, incluindo aspectos anatomo-patológicos, clínicos^f e terapêuticos, e etiopatogénicos (dando eco às opiniões de CHARCOT, e considerando as alterações vasculares como sendo fenómenos secundários). À semelhança de RINDFLEISCH, na opinião deste autor respeitante à

1885; 16: 698-710; Buchwald, A. “Über Multiple Sklerose des Hirns und Rückenmarks“ *Deutsches Archiv für klinischer Medizin* 1872; 10: 478-514.

^f A este respeito, dever-se-á, provavelmente, atribuir a FERREIRA DE MOURA a primeira descrição de um doente com Esclerose Múltipla em Portugal. No mesmo trabalho, o autor descreve o caso de um doente seu “o Sr. Ignacio do Rio Carvalho, ex-empregado do arsenal do exercito [...] actualmente reformado, em virtude da decisão da junta militar de saude, que o julgou incapaz de servir”. Apesar dos detalhes clínicos serem escassos, o doente “[...] homem inteligente e de um caracter vivo [...]” comparava “[...] o seu cerebro a um junco flexível, ao extremo do qual se achasse pendente um corpo [...] a cabeça, a região occipital, a porção cervical da espinha tornaram-se para elle a séde de uma sensação penosissima e indiscriptivel. A derme, n’estes pontos acha-se em um evidente grau de hypersthesia; o enfraquecimento dos membros inferiores é muito consideravel, permittindo a muito custo a marcha; o tremor torna-se visível nas mãos a qualquer movimento voluntário”; “[...] Este doente accusa ainda, em grau muito notavel, essa sensação particular do ouvido, semelhante a um continuo susurro”; “[...] Ha de particular n’este doente que a ingestão dos alimentos no estomago lhe produz um estado de angustia consideravel; - alimenta-se, diz elle, em virtude do sentimento do dever de conservação; mas satisfazendo esse dever à custa de um dolorosissimo martyrio”. Infelizmente, não nos são dados outros detalhes sobre o aparecimento da doença, nem sobre a sua evolução clínica, ou sobre eventuais exames histopatológicos. Não deixa, no entanto, de merecer a pena a atenção para este trabalho pioneiro na Neurologia portuguesa.

natureza da doença, “não se pode deixar de ver n’ella[s] o resultado de uma irritação formatriz; isto é, um verdadeiro processo inflammatorio de marcha chronica”. Nos anos seguintes, outros autores nacionais publicam pequenos, mas interessantes trabalhos sobre este tema. António d’ABREU FREIRE (depois Egas Moniz) descreve, em 1895, o caso de um doente com Esclerose em Placas e enfisema pulmonar internado na Enfermaria-Eschola da Universidade de Coimbra, com tremor generalizado e da voz, turvação periódica da visão, diplopia e nistagmo, alterações dos reflexos fotomotores, ataxia da marcha, alterações das sensibilidades superficiais e profundas dos membros inferiores (18). Por sua vez, Virgílio MACHADO (um dos precursores, menos conhecidos, da Neurologia portuguesa, mas o fundador do primeiro Serviço de Neurologia português no Hospital de São José (19, 20)), relata, em 1897, um caso que considera uma forma fruste de Esclerose em Placas, caracterizado apenas por um tremor intencional pós-hemiplegia alterna (21). Miguel BOMBARDA, em 1908, descreve um caso com manifestações predominantemente cognitivas e psiquiátricas, e evidente labilidade emocional (características clínicas que têm sido, novamente, realçadas nestes doentes nos últimos tempos) (22). No Brasil, esta nova entidade patológica é, também, alvo de trabalhos de síntese como os de Arthur EARP e Joaquim Corrêa DIAS (23). No seu conjunto, estes trabalhos são importantes sobretudo pelo que dizem sobre a evolução da Neurologia enquanto especialidade clínica em Portugal, e do crescente interesse das patologias neurológicas no final do século XIX, do que propriamente pela sua originalidade ou contribuição para o conhecimento científico desta patologia. Em qualquer dos casos descritos, o diagnóstico é baseado somente na observação clínica, não sendo relatados pormenores da evolução, ou dos exames histopatológicos que possam confirmar o diagnóstico. Não deixa de ser interessante, como tal, que FERREIRA DE MOURA termine o seu trabalho dizendo “Esperemos que [...] este trabalho consiga merecer a atenção dos nossos praticos, servindo de incentivo para novas investigações, fim unico que nos moveu á sua publicação” (17).

No que diz respeito à etiologia primária das lesões, na altura em que esta entidade foi definida não havia, ainda, qualquer noção sobre o papel que o Sistema Imune poderia desempenhar na génese das doenças neurológicas. No final do século XIX, a Imunologia enquanto disciplina autónoma estava, ela própria, a dar os primeiros passos (24, 25). Para além da vacinação anti-varíola de JENNER (1749-1823), só com os trabalhos de PASTEUR (1822-1895) o conceito de imunidade (do latim *immunitas*, livre de impostos ou obrigações) veio a aplicar-se à capacidade específica dos organismos de combater agentes infecciosos. No que diz respeito à imunidade humoral, RICHET e HERICOURT (1888) identificaram a capacidade do soro de um animal imunizado conferir protecção contra o agente imunizador e PFEIFFER (1889) descobriu a capacidade de discriminação do sistema imune entre agentes semelhantes. Mais tarde, BEHRING e KITASATO (1890) demonstraram a capacidade antitóxica neutralizante do soro de animais imunizados com toxina tetânica e diftérica, levando à atribuição do primeiro Prémio Nobel de Medicina e Fisiologia a Behring em 1901. BORDET (1895) demonstrou que a capacidade lítica no soro estava dependente de dois componentes distintos, um termolábil e não-específico (mais tarde denominado complemento) e outro termoestável e específico (anticorpo); EHRLICH, em 1896, postulou, sem qualquer evidência experimental, que a especificidade da reacção antigénio-anticorpo se baseava num modelo chave-na-fechadura em que as células capazes de formar anticorpos possuíam na sua membrana receptores específicos – denominados de “cadeias laterais” - para os antigénios imunizadores, e que, em resposta à imunização, produziam estes receptores em forma solúvel e grandes quantidades (trabalho agraciado com o Prémio Nobel em 1908). A teoria da imunidade celular teve origem nos trabalhos pioneiros de Ilya MECHNIKOV (1845-1916, co-laureado com o Nobel em 1908) que descreveu em 1882 o fenómeno da fagocitose em larvas de estrela-do-mar; a partir destes trabalhos, MECHNIKOV identificou vários tipos de células com esta capacidade, incluindo os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos, e postulou que este seria o principal mecanismo responsável pela defesa

contra infecções e pela reacção inflamatória (26). Este conceito estava contra o consenso geral dos patologistas, baseados nos trabalhos de VIRCHOW (1871), COHNHEIM (1873) e ARNOLD (1875), que consideravam a inflamação sobretudo um fenómeno de lesão vascular provocada por agentes metabólicos acumulados localmente (25). Este conceito da origem vascular das lesões inflamatórias continuou a infiltrar-se na literatura sobre a patogénese da Esclerose Múltipla até meados do século seguinte, como veremos adiante. A ponte entre a imunidade humoral e celular, conciliando estas duas teorias sobre a reacção imune, viria a ser feita, mais tarde, pela descrição do fenómeno de opsonização por WRIGHT e DOUGLAS (1903).

Como se pode constatar, na altura em que CHARCOT e VULPIAN estabelecem a EM como entidade, não existe ainda, sequer, uma ideia concreta sobre a forma de actuar do sistema imune (nem sequer da sua existência enquanto tal), e longe se estaria, mesmo, de suspeitar do seu envolvimento. A etiopatogenia da doença permanece, como tal, nestes anos iniciais da sua história, um mistério. A própria raridade da doença, presumida inicialmente, dificulta a sua investigação; só com os trabalhos de BRAMWELL no início do século XX a comunidade científica se apercebe da relativa frequência desta patologia, sobretudo dentro do conjunto das doenças do Sistema Nervoso (27). Outra dificuldade inicial foi a diferenciação desta nova entidade clínica de outras “escleroses” do Sistema Nervoso, descritas por exemplo por WESTPHAL, STRUMPELL, MARBURG, SCHILDER, PELIZAEUS e MERZBACHER na viragem do século XIX (10); a esta dificuldade acrescentava as numerosas denominações nosológicas, tal como a *pseudosklerose* de WESTPHAL ou STRUMPELL, ou a *encephalitis periaxialis scleroticans* de MARBURG (10).

Num famoso tratado de medicina do final do século XIX (*Traité de Médecine* de CHARCOT, BRISSAUD e BOUCHARD) são, ainda, citadas, por PIERRE MARIE, como teorias contemporâneas as do “refroidissement, surmenage, excès et [...] traumatismes” (28). Outros autores, como MULLER e STRUMPELL, consideravam haver um defeito congénito da nevrógia, levando a uma degeneração gradual da substância branca (29), ou uma

hipertrofia glial primária, respectivamente (STRUMPELL 1896, citado por MAGLIONE (30). Pistas sobre etiologia surgem do exame histológico das lesões escleróticas; inicialmente, o próprio CHARCOT considera que a perda de mielina era devida a um mero efeito mecânico, compressivo, da proliferação conjuntivo-glial, com manutenção dos axónios por maior capacidade de resistência (31, 32).

No seguimento dos trabalhos de RINDFLEISCH sobre a focalização perivascular das lesões escleróticas, FROMANN (1864) identifica a natureza fundamentalmente desmielinizante das lesões da Esclerose em Placas (4). A natureza do insulto primário da mielina continua por esclarecer, no entanto: alguns autores, como JACQUIN, consideram existir um problema primário de nutrição que levaria à liquefacção da mielina, enquanto que RIBERT parece ser o primeiro a observar a presença de glóbulos brancos nas lesões, para onde teriam migrado por diapedese e que estariam repletos de “gouttes de myéline” (citados por BABINSKI (33)). No entanto, para este último autor, a absorção da mielina efectuada por estas células dar-se-ia apenas depois desta substância ter sido lesionada, e.g. por compressão do tecido conjuntivo (33). BABINSKI (33), em 1885, observa nas placas medulares de Esclerose Múltipla, tal como CHARCOT anteriormente, a relativa preservação dos cilindros-eixos (axónios) e células nervosas, embora ressalve que no centro das lesões pode existir destruição axonal. Mais ainda, este autor refere a relação entre o desaparecimento das bainhas de mielina e o aparecimento de células “carregadas” de mielina, e que, portanto, “ces deux phénomènes sont connexes et que la destruction des gaines résulte de l’absorption de la myéline par le protoplasma de ces cellules” (33). Quanto à origem destas células, BABINSKI opõe-se a que sejam geradas a partir do próprio protoplasma mielínico, e, ao contrário, sustenta que são células de nevrógia, ou células migratórias, à semelhança do descrito por RANVIER nas lesões traumáticas do nervo periférico. Na Esclerose em Placas, as lesões não se originam por compressão mecânica, mas são um “phénomene vital” que resulta da actividade nutritiva das células da nevrógia e migradoras. Por último, observando que nas placas se encontram

frequentemente vasos sanguíneos de paredes espessadas, e com várias camada de núcleos, o autor salienta a importância do fenómeno inflamatório de origem vascular (33). A partir da histologia, tinham sido encontrados os primeiros sinais do envolvimento do Sistema Imune na etiopatogénese da Esclerose Múltipla.

Baseado na coincidência frequente de infecções agudas diversas com o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença, PIERRE MARIE é, provavelmente, o primeiro proponente da etiologia infecciosa para esta doença: “La véritable cause de la Sclérose en plaques et peut-être la seule consiste dans l’infection, ou mieux dans les infections” (28). Dada a diversidade de agentes, e de infecções associadas ao aparecimento da doença, o próprio autor considera improvável que as lesões sejam produzidas por acção directa dos agentes infecciosos sobre o tecido nervoso, e postula a existência de um segundo agente específico, que co-infectaria o doente e esse, sim, seria neurotrópico. Ao longo dos anos seguintes, e mesmo até hoje, esta teoria infecciosa teve como fruto a implicação sucessiva de vários agentes microbianos, bem como a sua negação. Nestes primeiros anos, no entanto, a teoria infecciosa assumiu preponderância considerável, sendo sobretudo interessantes do ponto de vista histórico as associações da Esclerose em Placas aos focos de cárie e granulomas dentários por Wagner VON JAUREGG (Prémio Nobel em 1927), a teoria esferulítica de CHEVASSUT e a teoria espiroquética de KUHN e STEINER (9).

O carácter transmissível da EM foi, inicialmente, proposto em 1913 por BULLOCK, que conseguiu induzir uma forma de mielite experimental em coelhos após inoculação de líquido cefalorraquidiano (LCR) proveniente de um doente com o diagnóstico clínico de Esclerose Múltipla (34). Este autor postulou a existência de um agente “filtrável” responsável pela transmissão da doença. Os agentes filtráveis, denominados nesta altura, genericamente, de “vírus”, poderiam corresponder quer a toxinas ou produtos bacterianos não filtráveis, quer ao tipo de agente infeccioso a que hoje denominamos de vírus. A teoria de esferulítica de CHEVASSUT, adiante descrita, é herdeira directa destas experiências iniciais, mas ainda

hoje são implicados agentes virais na patogénese da EM, desde as infecções virais comuns até a um recentemente descrito retrovírus associado a esta doença (MSRV, *Multiple Sclerosis RetroVirus*) (35-37).

Para além das infecções agudas implicadas por PIERRE MARIE, as semelhanças clínicas da Esclerose em Placas com a sífilis cérebro-espinhal, e o isolamento, na mesma altura, da espiroqueta responsável pela infecção sífilítica (SCHAUDINN, 1905), levaram FARQUHAR BUZZARD a propor, mesmo sem evidência experimental, que a Esclerose Disseminada poderia ser causada por um organismo do mesmo tipo, e que deveria ser tratado de forma igual, i.e., com arsénio, mercúrio ou com a recentemente descoberta preparação “606” de EHRLICH (38). KUHN e STEINER teriam encontrado uma espiroqueta no sangue e fígado de animais experimentais inoculados com LCR de doentes com EM (39), mas veio a provar-se, mais tarde, que o agente isolado era específico do coelho e sem capacidade patogénica para o humano. Apesar disso, empregaram-se tratamentos anti-sifilíticos em doentes com Esclerose Múltipla, e STEINER continuou a descrever a sua *Spirochaeta myelophthora* até aos anos 50 (40, 41), tendo a carreira deste organismo terminado apenas no início dos anos 60 (42-44). Ainda recentemente, no entanto, esta teoria voltou a dar provas de não estar completamente esquecida, tendo sido postulada a existência de uma espiroqueta oral, não identificada, que seria responsável pelo aparecimento da doença (45, 46). Outra ramificação desta teoria infecciosa, esta com maior peso científico e que tem gerado numerosa literatura, é a implicação do agente da doença de Lyme – *Borrelia burgdorferi* -, esse, sim, capaz de provocar quadros neurológicos diversos e potencialmente confundíveis com a Esclerose Múltipla (47-50). Como adiante discutiremos, mesmo que se possa assumir que uma infecção crónica – bacteriana ou viral - esteja na base da reacção inflamatória do SNC, na ausência da demonstração do agente infeccioso localmente ter-se-á, sempre, de considerar que, após este estímulo inicial, a reacção imune se autonomiza, pelo que os mecanismos patogénicos implicados passarão por uma resposta neuro-imune, inflamatória, descontrolada.

A história da teoria esferulítica é um exemplo particularmente interessante pelas lições dela decorrentes, e ainda hoje actuais, sobre a ética na investigação médica. Em dois extensos artigos originais publicados costas-com-costas na revista *Lancet* em 1930, Kathleen CHEVASSUT e Sir James PURVES-STEWART descreveram o isolamento de um novo microrganismo a partir do líquido cefalorraquidiano de doentes com Esclerose Disseminada, para o qual propuseram o nome *Spherula insularis*, e o desenvolvimento de uma vacina contra o mesmo (51, 52). Este organismo, cuja cultura, os próprios autores afirmam “requires special optic apparatus, together with a culture medium of particular delicacy” (52), teria sido isolado em 176 de 189 casos de Esclerose Disseminada, de todos os tipos de evolução, mas não de outras doenças neurológicas, e a sua transmissão experimental a 7 macacos teria resultado na indução de paralisia num deles. Uma vacina autóloga inactivada, desenvolvida por CHEVASSUT contra este novo organismo, foi testada em 128 doentes, dos quais 70 foram seguidos durante tempo suficiente para serem apresentadas estatísticas clínicas: dos 37 casos precoces ou moderados, 31 teriam exibido melhorias, contra apenas 9 dos 33 casos avançados. PURVES-STEWART, que era um reputado clínico, foi o próprio a afirmar que “[...]in assessing the value of any treatment special caution must be exercised, in view of the well-known tendency of disseminated sclerosis to undergo spontaneous remission”(52). A prova da sua dignidade, e ética, enquanto investigador, surgiria um ano depois: tendo sido impossível replicar os achados de CHEVASSUT por outros investigadores independentes, e sendo posta em causa a técnica empregue para o isolamento do agente infeccioso (53), foi pedida uma demonstração nos laboratórios do *Institute of Neurology* em *Queen Square* que “[...] for reasons of her own Miss Chevassut has refused to comply with my wishes and those of the Medical Research Council” (54). Como tal, PURVES-STEWART desligou-se, publicamente, de toda a investigação nesta área; CHEVASSUT abandona a cena em desgraça, e a teoria esferulítica entraria para os anais da investigação em Esclerose Múltipla

como um exemplo, e um aviso, dos erros – presumem-se inocentes – e da interpretação excessiva dos dados experimentais.

2. Da teoria infecciosa à teoria tóxica e alérgica. A vacinação anti-rábica, os acidentes pós-vacinais, e o aparecimento de modelos experimentais de doenças desmielinizantes.

Do que acima foi descrito, fica-nos que, no dealbar do século XX, a Esclerose Múltipla era uma entidade clínica bem definida e reconhecida internacionalmente, mas que, do ponto de vista etiopatogénico, estavam vivas, ainda, as maiores incertezas. Às teorias degenerativa, de MULLER e STRUMPELL, e infecciosa, de MARIE, acima mencionadas, juntava-se o crescente peso dos dados provenientes sobretudo dos estudos patológicos, e que implicavam, claramente, a resposta inflamatória. Eram evidentes, desde os trabalhos iniciais de RINDFLEISCH e FROMANN, tal como nos de outros autores subsequentes como BABINSKI, que, nas lesões desmielinizantes, existiam sinais de infiltração perivascular com células cuja origem era alternativamente atribuída ao Sistema Imune ou à degeneração da mielina (células granulosas adiposas). Nesta altura, a existência de células do Sistema Imune nas lesões era considerada a favor da etiologia infecciosa, enquanto os defensores da degeneração primária negavam a sua origem imune considerando-as, apenas, como acumulações locais de detritos mielínicos. Neste cenário, DAWSON, com base na análise histológica de lesões agudas, propõe que os danos primários sejam infligidos por um agente tóxico contra a mielina e as células gliais, e que o processo inflamatório seja uma consequência secundária da lesão (55). Já anteriormente OPPENHEIM (1911) tinha proposto que intoxicações com estanho, mercúrio ou óxido carbónico, pudessem estar na origem das lesões desmielinizantes (4, 30), abrindo, desta forma, a hipótese a uma heterogeneidade etiopatogénica. A teoria tóxica de DAWSON permitiria a unificação das opiniões díspares sob um conceito etiopatogénico abrangente: a Esclerose Múltipla seria uma mielite subaguda disseminada causada por

uma toxina solúvel em circulação, com afinidade especial para a mielina, capaz de causar a sua destruição e consequente reacção inflamatória de limpeza.

Restava o problema de identificar um agente tóxico capaz de provocar lesões específicas da mielina do Sistema Nervoso Central, e que, ao mesmo tempo, estivesse epidemiologicamente implicado no aparecimento de casos de Esclerose Múltipla. As propostas de OPPENHEIM nunca foram confirmadas, apesar de que ainda recentemente se tenha tentado implicar, novamente, o mercúrio, neste caso sob a forma das amálgamas dentárias, embora sem sucesso (56-59). Uma última, e curiosa, deriva da teoria tóxica foi a proposta identificação por BRICKNER (1931) de uma actividade lipolítica anormal no sangue de doentes com Esclerose Múltipla, a que atribuiu a génese das lesões desmielinizantes (60); o único mérito nesta teoria foi o de reafirmar a possibilidade da existência de inflamação e desmielinização sem a necessidade de um agente infeccioso (30)

Ao mesmo tempo que as teorias tóxica e infecciosa ganhavam adeptos, a produção experimental de lesões desmielinizantes com características semelhantes às da Esclerose Múltipla começou a assumir um papel crescente nos estudos sobre a etiopatogénese desta doença. A questão punha-se, nomeadamente, em relação ao facto de a ocorrência de lesões inflamatórias e desmielinizantes agudas no SNC evoluir sempre, ou não, para as lesões escleróticas crónicas observáveis nos doentes com EM[∞].

Uma das primeiras tentativas de abordagem deste problema foi feita por PUTNAM e colaboradores, que, injectando cães e gatos com toxina tetânica, ou emulsões de óleo de fígado de bacalhau intra-arterialmente, ou submetendo os animais a monóxido de carbono puro (100%), foram capazes de produzir lesões desmielinizantes consideradas semelhantes às lesões agudas de EM (61-63). Central a todos estes modelos era a existência de

[∞] O problema da correspondência entre as lesões nos modelos experimentais e nos casos de autópsia ou biópsia mantem-se, aliás, perfeitamente actual. De uma forma geral, as lesões produzidas experimentalmente nos diversos modelos animais reproduzem bem as alterações patológicas encontradas nas formas clínicas agudas, monofásicas ou monossintomáticas, mas não das formas crónicas (com algumas excepções). Este facto constitui uma das principais críticas aos modelos de encefalomielite experimental, e ao excesso de inferências imunopatológicas deles retirada e aplicadas à EM.

trombose venosa nos locais de ocorrência de lesões desmielinizantes (o que seria de esperar, aliás, dados os métodos de indução utilizados), levando a um ressurgimento da teoria vascular de RINDFLEISCH, e, conseqüentemente, a ensaios de terapêutica anticoagulante nestes doentes (64). Subjacente a esta reformulação da teoria vascular estaria a existência de uma toxina em circulação, que seria a verdadeira causa da doença; a produção de lesões desmielinizantes seria uma “via final comum” através da qual a presença desta toxina (qualquer que fosse a sua natureza) se manifestaria. No entanto, apesar da existência de algumas semelhanças patológicas entre os modelos de PUTNAM e as lesões agudas de EM – mas de forma nenhuma uma correspondência total -, não tinha sido possível encontrar um agente tóxico clinicamente associado, nem sequer produzir um modelo experimental que reproduzisse as manifestações clínicas da Esclerose Múltipla, e que permitisse, portanto, testar hipóteses patogénicas ou novas terapias.

Para o aparecimento de um novo paradigma etiopatogénico para a Esclerose Múltipla, nomeadamente o da implicação do Sistema Imune como actor primário e principal na origem desta doença, confluíram, com as observações previamente apresentadas, dados provenientes de duas outras fontes: as encefalomyelites pós-infecciosas e os acidentes pós-vacinais. A ocorrência de quadros de encefalomyelite aguda disseminada pós-infecciosa tinha sido descrita ao longo do século XIX por vários neurologistas como WESTPHAL, STRUMPELL ou MARIE. Este último – tal como, anteriormente, mencionámos – tinha inclusivamente apontado a ocorrência desses fenómenos como um dado a favor da sua teoria infecciosa (28). A relação entre estes quadros clínicos e a Esclerose Múltipla não sendo clara, era, pelo menos, de parentesco próximo. Não só as lesões agudas eram semelhantes histopatologicamente, como quadros de encefalomyelite disseminada podiam evoluir para formas definitivas de Esclerose Múltipla, facto bem conhecido dos neurologistas no princípio do século XX, tal como é relatado, entre nós, por Diogo FURTADO, num artigo de apresentação de alguns casos de encefalomyelite disseminada (65). Num trabalho de revisão

sobre este tema, Douglas MCALPINE, referindo-se a casos por si observados, de encefalomielite pós-infecciosa, pós-vaccinial e espontânea, assinala as semelhanças entre as duas patologias, apesar de considerar que “[...] my personal belief, which is without any valid proof, is that acute disseminated encephalomyelitis and disseminated sclerosis are caused by different virus [...]” (66). A infecção viral causadora da encefalomielite aguda disseminada geraria uma reacção imune suficiente para prevenir ataques futuros, o mesmo não se passando na Esclerose Múltipla. Tal como anteriormente afirmámos, é, hoje em dia, relativamente consensual que exista um espectro de doenças desmielinizantes primárias abrangendo as formas mono-sintomáticas e monofásicas como a encefalomielite disseminada e a doença de HURST, prolongando-se para a Esclerose Múltipla. Já nesta altura, no entanto, em virtude, sobretudo, dos estudos anatomo-patológicos feitos por autores como PUTNAM ou PETTE (67, 68), considerava-se que estas patologias apresentavam lesões fundamentalmente semelhantes nas suas características e etiopatogénese, diferenciadas, apenas, pela sua intensidade relativa e cronicidade (65). No que respeita à sua etiologia, a primeira correlação entre as encefalomielites pós-infecciosas e a auto-reactividade do sistema imune, com base no seu aparecimento tardio e na presença de outras reacções de tipo imunológico, foi feita por GLANZMANN a respeito da varicela e varíola, dando origem à teoria “alérgica”^f da etiologia da encefalomielite disseminada (69). Estes trabalhos foram rapidamente apoiados por VAN BOGAERT (70-72) e MARBURG (73) (citados por FURTADO (74)). VAN BOGAERT atribuía à encefalite perivenosa o significado de uma reacção alérgica do tecido nervoso aos componentes alergénios dos agentes infecciosos, enquanto que MARBURG acrescentou dados a favor da existência de fenómenos de hipersensibilidade imune nas lesões de Esclerose Múltipla. Por analogia com a encefalomielite pós-infecciosa, portanto, a Esclerose Múltipla aparecia como uma forma

^fNote-se que, nesta altura, o termo “alérgico” não tinha as mesmas conotações técnicas que hoje em dia, aplicando-se de uma forma genérica a todos os tipos de reacção imune exagerada. Actualmente, reserva-se este termo apenas para tipos de hiperssensibilidade imune não-autorreactiva, normalmente por exagero da resposta mediada por linfócitos Th2, IgE, mastócitos e basófilos.

crónica de encefalomielite “alérgica” baseada, sobretudo, na semelhança morfológica entre as lesões desmielinizantes nestas duas patologias. Como veremos adiante, existe, actualmente, evidência de que a Esclerose Múltipla não é uma doença uniforme do ponto de vista patológico, existindo variedades que, sendo raras, são claramente excepções a esta analogia. Recentemente, confirmou-se que, nas encefalomielites perivenulares, pós-infecciosas, nomeadamente nas que ocorrem após o sarampo, existe uma reacção autoimune contra antigénios presentes na substância branca cerebral, como a proteína básica de mielina (75).

A segunda grande influência para o desenvolvimento da teoria alérgica/autoimune da etiopatogénese veio, indirectamente, de uma área *à priori* não relacionada com a Esclerose Múltipla, nomeadamente a partir dos estudos realizados para a compreensão dos acidentes pós-vacinação anti-rábica. No final do século XIX, esta doença infecciosa, bem caracterizada desde os trabalhos de VAN SWIETEN em meados do século anterior, continuava a ser um flagelo – não tanto pelo número de casos^o, mas sobretudo pela sintomatologia e o sofrimento atroz que causava - para o qual não existia qualquer tipo de tratamento eficaz. Os tratados de Medicina contemporâneos, como o de LAVERAN em 1879 (76) aconselham, como profilaxia, para os doentes mordidos, durante o período de incubação “[...] les bains de vapeur et un système d’entraînement qui augmente l’activité nutritive des tissus. Il faut surtout rassurer les individus qui ont été mordus, leur épargner toutes les émotion vives, toutes les allusions à l’accident don’t ils ne sont que trop portés á se préoccuper [...]”, até porque, uma vez a doença declarada “Lorsque la rage est confirmée, la principale indication est de soulager les souffrances des malades [...]”, enquanto aguardavam o desfecho inevitável. Neste cenário, a introdução da vacina anti-rábica de PASTEUR em 1885 foi uma verdadeira revolução, não só terapêutica mas, sobretudo, conceptual, e uma real vitória dos métodos de investigação científica para as emergentes disciplinas da Microbiologia e

^o LAVERAN, no seu tratado de 1879 (76), dá conta de apenas 685 casos de morte em França durante o período de 1850 a 1872, ou seja, cerca de 30 casos por ano.

Imunologia. Pouco tempo depois do aparecimento desta nova arma terapêutica, no entanto, e da sua utilização mais ou menos disseminada, começaram a ser reportados casos de sintomas neurológicos, e, mesmo, de paralisia, após a vacinação – denominados acidentes pós-vacinais, ou acidentes neuro-paralíticos. Inicialmente, esta forma paralítica de raiva (“dumb rabies”), semelhante à que VAN SWIETEN tinha já descrito em 1753, foi considerada como o resultado da vacinação com o “vírus fixo” preparado experimentalmente, e, mesmo, como “raiva de laboratório” pelos detractores do trabalho de PASTEUR. Entre nós, devem ser mencionados os trabalhos de Carlos FRANÇA sobre a raiva, e sobre este mesmo assunto, o relato de um caso de morte pós-vacinação, provocada, aparentemente, pela inoculação de um vírus da raiva pouco atenuado (77-79). Devem, no entanto, ser distinguidos estes casos dos verdadeiros acidentes neuro-paralíticos, cujas manifestações e etiologia são diferentes.

STUART e KRIKORIAN (1928), fazendo uma revisão sobre este tema, assinalam que entre 1885 e 1887 (os três primeiros anos de utilização da vacina), 4836 indivíduos tinham sido tratados, sem que tivesse ocorrido qualquer acidente (80). A partir de 1888, começam a surgir os primeiros relatos deste efeito inesperado da vacinação, como os de GONZALES (1888), FERRAN (1888), BAREGGI (1889) e LAVERAN (1891) (citados por STUART e KRIKORIAN (80)); nesta altura, o consenso parecia ser de que estes doentes padeciam de uma forma atenuada de raiva modificada, benéficamente, pela vacinação. TONNI (1889) parece ser o primeiro autor a relatar um caso de paralisia pós-vacinal num doente mordido por um animal que se veio a provar não ter raiva, com a implicação imediata de que o acidente neuro-paralítico tinha sido causado pela vacinação ela própria (80). A ocorrência destes acidentes era rara, e as suas manifestações clínicas diversas; REMLINGER (1905) descreve apenas 40 casos em 107 712 vacinações (81), e na primeira conferência internacional sobre raiva da Liga das Nações, em 1927, MARIE, REMLINGER e VATTEE reportam um total de 529 casos em 1 164 264 vacinações (80). Eduard MULLER, a propósito de um caso por si observado, revê a literatura existente até então, e comenta

sobre o prognóstico habitualmente favorável destes casos, bem como sobre a localização provável das lesões na medula dorsal (82).

Quanto às suas manifestações, STUART e KRIKORIAN (1930) referem a existência de três tipos principais de quadro clínico: formas neuríticas simples por paralisia de nervos periféricos (cerca de 35% dos casos); formas de mielite dorso-lombar (30% dos casos) e paralisias ascendentes do tipo LANDRY (35%), com desfecho ocasionalmente fatal (83). Por sua vez, REMLINGER (1937) descreve 202 casos com múltiplas manifestações: mielite dorso-lombares, paralisias ascendentes de LANDRY, meningo-encéfalo-mielites difusas e manifestações nevríticas diversas (84). Finalmente, MCFADZEAN (1952) classifica-os em vários grupos: neuropatias simples envolvendo os nervos cranianos ou periféricos; mielite dorso-lombar; paralisias do tipo LANDRY (i.e. Síndrome de GUILLAIN-BARRÉ); meningo-encefalo-mielites tipo GORDON; meningo-encefalites sem paralisia (85). Para tornar ainda mais confusa a situação, nos primeiros anos após a introdução da vacinação, numerosas modificações foram sendo introduzidas nas condições de produção de vacina e nos esquemas de vacinação empregues; HARVEY e ACTON (1923) referem pelo menos 4 métodos diferentes de preparação de vacina (método de secagem medular de Pasteur, método de diluição de HOEGYES, métodos de vírus morto por ácido carbólico (FERMI), calor (BABÈS e OSIDA), ou dissecação (HELLER e POOR), e misturas de vírus e soro de BABÈS e MARIE), aos quais se juntavam modificações várias na duração do tratamento, quantidade de vírus inoculado e uso de vírus vivo (86). Sobre o mesmo tema da incidência destes acidentes, STUART e KRIKORIAN tecem comentários extensivos sobre a influência de variáveis como a idade, sexo, raça, ocupação, estação, ano e período, tipo de animal mordedor, método de tratamento (enunciando todas as formas de preparação de vacina utilizadas correntemente) e a predisposição individual^f (80).

^f Citando os autores: “Emphasis has already been laid on the greater predisposition to paralytic accident in general of the brain worker as contrasted with the manual labourer, of the male relative to the female, and on the greater liability of the European in tropical countries than the indigenous population” (80). Este comentário, obviamente datado, é

Como anteriormente dissemos, inicialmente a etiologia destes acidentes era atribuída à reactivação do “virus fixée”, ou, em alternativa, à eficácia parcial da vacinação contra a doença, convertendo-a em raiva paralítica. Casos como o de TONNI, no entanto, voltaram a colocar a ênfase nos efeitos adversos dos componentes da própria vacina. Nos 40 anos seguintes, várias foram as hipóteses defendidas para justificar a ocorrência destes acidentes; enumerando as várias teorias competidoras, STUART e KRIKORIAN (1928) referem: infecção por vírus selvagem modificada ou curada por inoculação com vírus fixo; vírus fixo nas inoculações como causa; efeitos de uma toxina rábica libertada pelas emulsões de vírus fixo; presença de enzimas libertadas no inóculo durante a sua preparação; aparecimento no sangue dos indivíduos tratados de fermentos defensivos anti-nervo (“anti-nerve defensive ferments”)^o; infecções bacterianas acidentais durante o tratamento; susceptibilidade individual (“genius epidemicus”); anafilaxia; vírus neurotrópicos, e os efeitos da substância nervosa normal injectada (80). Das últimas três, eliminadas as restantes teorias por falta de evidência de suporte, a hipótese anafiláctica é descartada por estes autores pela ausência de reais fenómenos anafilácticos ou alérgicos durante a vacinação, a não ser, eventualmente, no local de injeção. A presença de uma infecção combinada com um vírus neurotrópico presente no inóculo vacinal tinha sido inferida pela identidade histopatológica (desmielinização perivascular) das lesões de encefalomyelite aguda disseminada, pós-varíola ou sarampo, com as dos acidentes neuro-paralíticos, mas nunca tinha sido possível obter qualquer confirmação experimental da sua existência e, mais ainda, os métodos de inactivação do vírus da raiva inevitavelmente deixá-lo-iam

curioso pelas implicações sociológicas e antropológicas que revela sobre a Medicina do princípio do século XX; as doenças do Sistema Nervoso, e os acidentes neuromusculares afectam os mais evoluídos - homens intelectuais europeus -, por oposição aos restantes – mulheres trabalhadoras manuais e indígenas.

^o Trata-se de uma alegoria sobre a indução de uma reacção imune pela inoculação com uma substância antigénica; notavelmente, os autores negam a sua validade porque conseguem induzir acidentes paralíticos também com autoantigénios, o que violaria o conceito do *horror autotoxicus* : “This theory of defensive ferments as etiological factor offers an undoubtedly attractive solution [...] negatived by experiments carried out by the present authors, who have produced typical paralytic accidents in rabbits by the inoculation not only of heterologous, but of homologous nerve substance [...]”.

igualmente sem capacidade patogénica. Restava o contributo específico da substância nervosa injectada. Enquanto experiências iniciais de tratamento da raiva com extractos de encéfalo normal por BABÈS (1892) pareciam ter tido resultados positivos (citado por HARVEY e ACTON (86)), no seu seguimento CENTANNI (1898) e AUJESZKY (1900) não só não confirmaram estes resultados, como relatam que a imunização com extractos de substância nervosa normal podia provocar perda de peso, convulsões e paralisia em animais experimentais (87, 88). Eugenio CENTANNI (1898), investigando o efeito dos “produtos tóxicos secundários” produzidos pela decomposição dos tecidos causada pelas infecções^f, nomeadamente pela difteria, raiva e pneumococos, faz inoculações em coelhos de uma emulsão filtrada de sistema nervoso autólogo em soro fisiológico, e relata que, em vários destes animais, se verificava perda de peso e morte, de causa não esclarecida, mas que na opinião do autor se devia a uma “intoxicação grave e mortal”^o (88). De acordo com estes investigadores, REMLINGER (1905), e HARVEY e MCKENDRICK (1908), consideraram que os acidentes neuro-paralíticos tinham como origem a grande quantidade de matéria nervosa injectada durante o tratamento, e não o vírus da raiva modificado (80, 89). REMLINGER, em 1919, confirma a indução de um quadro de mielite experimental em coelhos inoculados com extractos homólogos de encéfalo (90), e HARVEY e ACTON (1923), conseguem induzir paralisia em coelhos por injeção de uma suspensão carbolizada de 4% de cérebro normal, embora não reportem os achados neuropatológicos. Imunizações com encéfalo normal tornaram igualmente os animais mais susceptíveis à raiva experimental (86).

^f No original: “Ciò portava a supporre che, quando un agente infettivo è introdotto nel corpo [...] bisogna tener conto [...] anche dei prodotti di decomposizione che si sviluppano dai tessuti così alterati [...]”. Segundo o autor “[...] la tossicità di un tessuto normale, morto, riassorbito allo stao asettico dall’animale stesso, è un punto ancora rimasto poco esplorato [...] Io ho voluto formarmi una convinzione personale su questo genere di tossicità per quel che riguarda il sistema nervoso”.

^o Ibid: “Risulta adunque confermato che il sistema nervoso di coniglio sano, in certe condizioni speciali di riassorbimento, e per certe forme di alterazione semplice che l’ha colpito, può diventare pel coniglio stesso, anche a piccole dosi, sorgente di intossicazioni gravi e mortali”.

Todas estas observações, no entanto, apresentavam deficiências quer no diz respeito ao método e dosagem de inoculação, mas, sobretudo, pela ausência de estudos neuropatológicos completos que permitissem atribuir uma origem definitiva aos sintomas observados. Mais ainda, existia uma ausência de dados neuropatológicos detalhados sobre casos de acidentes neuro-paralíticos clinicamente confirmados; GETZOWA (1933), ao relatar, pormenorizadamente, os achados neuropatológicos de 2 casos de paralisia de LANDRY pós-vacinal, resume os 24 casos com estudo neuropatológico publicados entre 1908 e 1930, todos eles referentes a mielites pós-vacinais que haviam sido classificadas como encefalomyelites agudas disseminadas (91).

Esta abordagem sistemática dos efeitos da imunização repetida de animais experimentais com múltiplas doses de extractos de substância nervosa normal foi desenvolvida sobretudo por SCHWEINBURG (1924), e depois KORITSCHONER e SCHWEINBURG (1925) (92, 93), considerados, por muitos, como os principais precursores no estabelecimento do modelo de encefalomyelite autoimune experimental. Estes autores começam por relatar um conjunto de observações clínicas de 39 doentes com acidentes vacinais com 8 casos fatais, dos quais 7 foram submetidos a um exame neuropatológico que revelou extensas alterações medulares: edema, congestão medular, mielite disseminada severa, por vezes com focos hemorrágicos (anteriormente referidas por GETZOWA (91)). Considerando todas as teorias vigentes sobre a causa destes acidentes (mencionando sensivelmente as mesmas que STUART e KRIKORIAN), acabam por se fixar sobre o papel da substância nervosa normal e colocam a hipótese de que “[...] wenn die normale Nervensubstanz (die durch Trocknen oder Erhitzen veränderte, aber von einem gesunden Tiere stammende) tatsächlich die Lähmungen bei der Wutschutzimpfung hervorruft, so muß es möglich sein, durch wiederholte, subkutane Injektion solcher Nervensubstanz im Tierversuch gelegentlich solche Lähmungen zu

erzeugen [...] (93)”^f. De forma a testar esta hipótese, procedem a uma série de experiências de imunização diária de coelhos, durante 14 dias, com vacinas preparadas pelos métodos de PASTEUR e de BABÈS-PUSCARIU, bem como com medula humana fresca, após 8 e 14 dias de secagem, ou aquecimento a 80°C; obtiveram, por este método, números de incidência de doença e mortalidade (animais inoculados/animais doentes/animais mortos) de 36/7/5, 8/2/1, 10/2/1, 8/3/2, 8/1/1 e 8/1/1, respectivamente (93). Animais de controlo imunizados com extractos de músculo, fígado e baço não desenvolveram sintomas neurológicos. Os quadros neurológicos descritos são compatíveis com os acidentes neuro-paralíticos habituais: paralisia das extremidades (“Extremitätenlähmung”) e mielite transversa (“Lähmung der Hinterbeine”). Mais importante ainda, e em oposição a todos os trabalhos que tinham sido descritos até então, os autores relatam o exame anátomo-patológico detalhado destes casos, com especial destaque para a medula espinhal, onde encontram sinais de degeneração, edema, hiperemia e alguns focos hemorrágicos, particularmente na substância cinzenta, e infiltrados perivasculares ocasionais. O paralelismo entre estes achados patológicos experimentais e os encontrados nas observações clínicas mencionadas - retornando ao ponto de partida do trabalho, numa arquitectura em espelho - é evidente, comprovando-se, como tal, o postulado dos investigadores. A força deste trabalho, como tal, consiste não só na abordagem sistemática do problema, mas, sobretudo, na realização de um conjunto de experiências com grupos de controlo apropriados, e na correlação anátomo-clínica realizada. No que diz respeito à natureza concreta deste fenómeno, i.e., qual o mecanismo através do qual a “normale Nervensubstanz” provocava lesões inflamatórias, os autores consideram a existência de uma cito-toxina derivada do conteúdo lipídico do tecido nervoso: “[...] Dagegen läßt es sich

^f N.T. “ [...] Se a substância nervosa normal (modificada por aquecimento ou secagem, mas proveniente de um animal saudável) provoca realmente a paralisia na vacinação anti-rábica, deve ser possível, através de injeções subcutâneas repetidas desta substância nervosa, produzir, ocasionalmente, paralisia em experiências animais [...]”.

theoretisch nicht entscheiden, ob ein Wuttoxin oder ein Gift der Nervensubstanz an sich die Lähmungen hervorruft [...]’ (93).

Outro trabalho pioneiro nesta área foi o de Yoneji MIYAGAWA e Shintaro ISHII (1926) ((94)) desenvolvido na Universidade Imperial de Tóquio, o qual, infelizmente, não teve, depois, seguimento. Estes autores, baseando-se no trabalho prévio de outros autores japoneses como Takekichi SUGAI e Sei TOMITA, propuseram-se determinar “[...] whether or not we can produce the phenomenon of direct action by parenterally instilling the constituents of central nerve cells into a living organism [...]” (94). Num trabalho anterior de MIYAGAWA, este autor havia definido a acção directa como o efeito de estimulação produzido nas células de um órgão pelos componentes subcelulares das células mortas, pelo processo de senescência normal desse mesmo órgão; existiria uma estimulação fisiológica constante do funcionamento dos órgãos dessa forma, independente dos outros mecanismos de controlo homeostático (95). Como corolário desta teoria da acção directa, MIYAGAWA propunha que “se as células de um órgão ou tecido forem injectadas parentericamente no organismo vivo, elas actuam nas células homólogas”, e distingue esse efeito do produzido por estimulação do sistema imunitário (95)^o. Neste trabalho, foram usados ratos albinos injectados intraperitonealmente, ou coelhos injectados subduralmente, com emulsões de componentes do sistema nervoso central de coelhos e bovinos em grande quantidade (emulsões a 10% em água destilada de cérebro, cerebelo ou medula espinhal; a quantidade injectada e o número de injeções foi muito variável, em média entre 3 a 5 gramas de emulsão, mas até o

^f N.T. [...] não é teoricamente distinguível se uma toxina da raiva, ou um veneno da substância nervosa provoca a paralisia por si mesmo [...]

^o Na explicação do seu racional para esta experiência, MIYAGAWA e ISHII consideram que “[...] if functional disturbance of a tissue or an organ will be caused by the effect of strong direct action, and the changes of clinical symptoms manifested by it could be well recognized macroscopically, strong stimulation would be a proper method for examining the presence of direct action [...]. A injeção de extractos de um órgão era vista por estes autores como uma forma de estimular a função dos mesmos (acção directa) que, no seu exagero por sobreestimulação, poderia causar alterações patológicas dos mesmos: “[...] when the constituents of central nerve cells are injected [...] they will be absorbed and enter the blood circulation and have direct action on the tissues of brain and spinal cord [...] Our findings were simply the case of strong stimulation by specially large dose of injecting material [...]. It is our belief that if we properly vary the dose, instead of pathologic change, quickening of functioning would result”.

máximo de 52 gramas, em injeções repetidas entre 2 e 52 vezes). De forma consistente, e após 7 ou 8 injeções, muitos dos animais experimentais (cerca de 70% do total) apresentavam uma paralisia dos membros inferiores, normalmente unilateral, por vezes com extensão ao lado contrário e aos membros superiores. A análise histológica detalhada do sistema nervoso destes animais revelou a presença de “[...] tigrolysis [...], nuclear degeneration, various degeneration of nerve fibres, [...] degenerative metamorphosis of axis cylinder, together with various changes of metamorphosis and increase in glia cells, and often macroscopically and microscopically recognizable haemorrhagic foci [...]”. Embora o trabalho não tivesse sido realizado especificamente para responder a essa questão, estes investigadores concordam, nas suas conclusões, com os achados de SCHWEINBURG no que diz respeito à vacinação anti-rábica, de que os acidentes neuro-paralíticos são causados pela injeção da substância nervosa (94).

Pouco tempo depois destas investigações, STUART e KRIKORIAN, no seu trabalho de revisão, concordam com a teoria citotóxica (sobre a existência de um componente tóxico, específico, da substância nervosa), embora afirmem não ser possível determinar, ainda, a natureza deste constituinte (80). Estes autores contribuem, eles próprios, com alguns estudos experimentais bem desenhados, realizados com inoculação de emulsões de cérebro autólogo e heterólogo (uma diferença importante em relação aos anteriores) em coelhos (235 animais) e ratos (100 animais), com e sem fenolização do inóculo. Distinguem entre a ocorrência de reacções anafilácticas por sensibilização ao inóculo, em que a morte é provocada por colapso circulatório, e de paralisia por afecção do Sistema Nervoso, e confirmam que a inoculação de substância nervosa autóloga e heteróloga pode provocar acidentes neuro-paralíticos, embora não providenciem detalhes histológicos (80). Ao contrário dos anteriores investigadores, não concordam com a correlação entre a quantidade de substância injectada e a ocorrência de paralisia (proposta por KORITSCHONER e SCHWEINBURG, bem como por MIYAGAWA e ISHII), e mostram que a capacidade de

indução de paralisia é dependente de um componente inactivável pelo fenol. Esta ausência de correlação com a dose, e a inferência de um componente especificamente inactivável, argumentariam a favor de uma hipersensibilidade individual ao inóculo – i.e., para algum elemento da resposta fisiológica à inoculação eminentemente variável entre indivíduos, como seja a resposta imune.

No seguimento dos anteriores trabalhos, WESTON HURST (1932) (96) realizou experiências de injeção subcutânea e intramuscular em coelhos, de suspensões de cérebro normal em soro fisiológico (inicialmente suspensões a 10% aquecidas a 55°C durante 1 hora e meia, seguidas de suspensão a 20% aquecida ou não; para os cérebros de primatas foram utilizadas suspensões não aquecidas, em 4 casos, carbolizadas), utilizando uma série de animais heterólogos dadores (cobaio, ovino, humano e macaco). Foram feitas inoculações sobretudo diárias, durante períodos variáveis (entre 5 e 68 dias), seguidas de uma análise histopatológica detalhada dos resultados. A grande maioria dos animais experimentais faleceram em consequência ou de processos infecciosos, ou subitamente sem que fosse encontrada uma causa de morte no exame necrópsico; apenas em 4 coelhos (2 injectados com cérebro humano, e 2 com cérebro de macaco) foram detectados sinais clínicos de paralisia, mas, surpreendentemente, no exame neuropatológico não foram encontradas quaisquer alterações. Estes resultados levaram HURST a propor um efeito tóxico, não-específico, da injeção de substância nervosa (causador da morte da maioria dos animais por deterioração inespecífica do estado geral), mas que, dada a raridade da ocorrência de paralisia nos seus trabalhos, e a ausência de confirmação histológica dos mesmos, “[...] there is insufficient evidence to warrant that the paralytic accidents of antirabic treatment are directly due to the foreign nervous substance injected” (96).

Como se depreende da análise dos trabalhos anteriores, os passos iniciais dados para a compreensão dos acidentes neuro-paralíticos pareciam convergir, cada vez mais, para uma analogia com as encefalomyelites pós-infecciosas, baseada na semelhança de achados histopatológicos. É

igualmente evidente que as experiências até então realizadas eram demasiado dissemelhantes entre si, no que diz respeito aos métodos utilizados (desde a escolha do animal experimental, métodos de preparação do inóculo, dosagens utilizadas, duração do tratamento, realização de exame histológico, *et coetera*), para que pudessem ser comparadas, ou para que se pudesse chegar a um consenso. Os resultados existentes pareciam apontar todos, no entanto, para a existência de uma reacção a um componente da substância nervosa, com consequências nocivas para o Sistema Nervoso Central, e resultando em quadros de mielite aguda semelhante aos pós-vacinais, ou mesmo pós-infecciosos. Faltava ainda, no entanto, a demonstração da existência de desmielinização induzida experimentalmente, a criação de um modelo reproduzível, e o esclarecimento da sua etiopatogenia.

É geralmente aceite que o trabalho desenvolvido pela equipa de Thomas RIVERS no *Rockefeller Institute* constituiu a base para o estabelecimento do modelo de encefalomielite alérgica/autoimune experimental, que foi, de seguida, aperfeiçoado por estes, e outros autores, até à criação da principal ferramenta experimental de investigação em doenças desmielinizantes (97, 98). O trabalho inicial de RIVERS prendia-se com o estudo de doenças virais, e com métodos de produção de vacinas; no que diz respeito à vacina anti-varíola, a equipa de RIVERS foi a primeira a desenvolver culturas de vírus em larga escala para utilização em humanos (99). Foi, igualmente, realizado trabalho fundamental sobre a psitacose, a febre do vale do Rift, e foram os primeiros a identificar a coriomeningite linfocitária viral em humanos (99). Entre os anos de 1933-1935, a equipa composta por Douglas SPRUNT, George BERRY e Francis SCHWENTKER, sob a tutela de Thomas RIVERS, dedicou-se ao estudo dos acidentes pós-vacinais e das encefalomielites pós-infecciosas – sendo que estes autores foram claros em considerar que estas situações constituíam uma mesma entidade, i.e., encefalomielite aguda disseminada caracterizada por desmielinização perivascular. Dado o seu interesse no uso da vacina anti-varíola, estes autores testaram, inicialmente, em macacos Rhesus, a

ocorrência de encefalomielite aguda após a inoculação intra-cisternal do vírus-vacina (em animais não imunes, parcialmente ou totalmente imunes), a inoculação intramuscular de emulsões e extractos de cérebro normal (tendo sido empregues emulsões em álcool, e extractos álcool-éter de cérebro de coelho em combinação), ou a combinação dos dois procedimentos. Enquanto que o uso da vírus atenuado não foi capaz, em qualquer das combinações, de causar danos neurológicos, a injeção repetida da combinação de emulsões e extractos de cérebro causou em 2 animais sinais clínicos de doença neurológica (ataxia e ataxia com hemiparésia esquerda), nos quais o exame histopatológico confirmou a existência de uma reacção inflamatória e desmielinização perivascular, afectando o tronco cerebral, cerebelo, espinal medula e cérebro (100). Para estes autores, a demonstração, por BRANDT, GUTH, MULLER, WITEBSKY e STEINFELD (101, 102), de que o cérebro continha uma substância lipoide álcool-solúvel capaz de induzir a formação de anticorpos fixadores de complemento, foi interpretada como um fortalecimento da hipótese de que as encefalomielites pós-vacinais e pós-infecciosas podiam estar associadas ao aparecimento de anticorpos anti-encefálicos (103). A formação destes anticorpos, no entanto, estava condicionada à junção de uma proteína heteróloga à substância nervosa homóloga, que só desta forma se tornava antigénica. De forma a testar a antigenicidade da substância nervosa, estes autores injectaram coelhos com emulsões frescas de cérebro homólogo, com ou sem adição de soro porcino, de animais normais ou infectados com vírus de vacina anti-varíola; a estas condições, juntaram, ainda, a injeção de um extracto alcoólico de cérebro e de uma emulsão parcialmente autolizada por ter ficado à temperatura ambiente até 30 dias (103). Os resultados deste conjunto de experiências confirmaram que as emulsões de cérebro normal fresco eram pouco imunogénicas, mas que a adição de soro porcino, a infecção com vaccinia e, ainda, a autólise, aumentavam, significativamente, a produção de anticorpos. A partir destas emulsões autolizadas, e utilizando um conjunto elegante de técnicas, SCHWENTKER e RIVERS conseguiram destrinçar a existência de anticorpos específicos e não-específicos para

componentes do cérebro (e.g. por testes de absorção com extractos alcoólicos de encéfalo), e, sobretudo, que a produção de anticorpos específicos estava proporcionalmente ligada à quantidade de mielina existente na emulsão (a antigenicidade da substância branca sendo cerca de 6 vezes maior que a da substância cinzenta, e a antigenicidade do encéfalo de animais fetais ou neonatais sendo praticamente inexistente) – significando, naturalmente, que a antigenicidade das emulsões de cérebro era devida a algum componente da mielina (103). Na mesma altura, também LEWIS (1934) tinha abordado este assunto e confirmado os resultados iniciais de WITEBSKY; no entanto, ao contrário de RIVERS, não foram realizadas imunizações com diferentes regiões do cérebro, de modo que a afirmação deste autor de que todas as regiões do encéfalo reagem com igual intensidade ao antisoro cerebral, não significa que não tenham antigenicidade diferente (104). De entre todas as emulsões utilizadas por SCHWENTKER e RIVERS, a constituída por cérebro autolizado foi, de longe, a mais imunogénica, e a capaz de provocar uma maior taxa de paralisia nos animais testados (32%) (103). Na discussão deste trabalho, os autores colocaram, claramente, a questão da relação entre as doenças desmielinizantes humanas (entre as quais não só as encefalomyelites pós-infecciosas e pós-vacinais, mas também a Esclerose Múltipla) e a produção experimental de focos desmielinizantes por inoculação de tecido nervoso, e, também, que a especulação sobre a etiologia destas doenças seria mais interessante podendo-se demonstrar a existência de antigénios cerebrais, ou anticorpos, no soro de doentes com doenças desmielinizantes (103).

O culminar destes dois trabalhos anteriores, e o fecho deste marco fundador da Encefalomyelite Autoimune Experimental em forma de tríptico de publicações, surgiu no ano seguinte. Partindo dos dados anteriores, RIVERS e SCHWENTKER expandem as suas experiências iniciais de imunização de macacos Rhesus com extractos álcool-éter e emulsões de cérebro heterólogo de coelho, de forma a confirmar a ocorrência de lesões desmielinizantes, tendo como grupo de controlo um idêntico grupo de animais alojados em condições idênticas, mas sem serem imunizados. Em 6

dos 8 animais imunizados apareceram sinais clínicos de lesão neurológica, e em 7 de 8 destes animais confirmou-se a existência de lesões desmielinizantes e infiltrados inflamatórios perivenulares. De forma a excluir a existência de algum agente infeccioso responsável por esta lesão, emulsões dos cérebros de animais doentes foram injectadas intracerebralmente em animais da mesma e outras espécies, sem que fosse possível reproduzir o aparecimento de desmielinização (105).

No seu conjunto, estes três trabalhos do grupo de RIVERS distinguem-se dos anteriormente realizados em vários aspectos. Os procedimentos experimentais são mais cuidados, fruto também da evolução das técnicas, os grupos de controlo permitem esclarecer inequivocamente o papel da substância nervosa, sobretudo no seu componente mielínico, como antigénica e responsável pela ocorrência das lesões no Sistema Nervoso Central, lesões que são, pela primeira vez, inequivocamente descritas como desmielinizantes e inflamatórias, e, como tal, equiparáveis às encontradas nas encefalomyelites pós-infecciosas, aos acidentes neuro-paralíticos e, também, às das formas agudas de Esclerose Múltipla. Os três artigos de RIVERS no *Journal of Experimental Medicine* são a ponte entre a investigação experimental sobre o problema das encefalomyelites pós-vacinais e o das doenças desmielinizantes primárias, com base nas analogias histopatológicas encontradas. No que diz respeito à etiopatogenia destas lesões, no entanto, e embora se suspeitasse, evidentemente, do envolvimento da reacção imune contra algum componente da mielina “[...] Although speculation about the relation of anti-brain antibodies to certain demyelinating diseases is extremely intriguing, further facts must be obtained before a reasonable hypothesis concerning the matter can be presented” (103).

Acrescentando ainda mais ao mérito destes autores, ao contrário da falta de reprodutibilidade que anteriormente tinha prejudicado a credibilidade dos dados obtidos por grupos diversos, os resultados experimentais do grupo do *Rockefeller Institute* iriam ser confirmados, de forma independente, por Armando FERRARO e George JERVIS

trabalhando no *New York State Psychiatric Institute*. Utilizando os mesmos métodos de preparação de emulsões e extractos álcool-éter, o mesmo regime e via de imunização, e o mesmo animal experimental, estes autores conseguem induzir sinais de doença neurológica semelhantes aos encontrados por RIVERS. Nos exames neuropatológicos realizados a estes animais (muito mais detalhados do que os anteriormente reportados), confirmam a natureza inflamatória e desmielinizante das lesões encontradas, sobretudo na substância branca cerebral, e estabelecem, uma vez mais, um paralelo com as lesões encontradas nas “encefalitides exantemáticas” e formas agudas de Esclerose Múltipla (106). No que diz respeito à etiologia destas lesões, FERRARO e JERVIS descartam a hipótese embólica, bem como a trombótica proposta por PUTNAM, por falta de evidência histológica; na sua opinião, o aparecimento de anticorpos específicos para o sistema nervoso, tal como proposto por WITEBSKY, LEWIS, SCHWENTKER e RIVERS, deveria ser o principal mecanismo subjacente a estas lesões. Finalmente, para além de admitirem um mecanismo semelhante para a ocorrência de acidentes neuro-paralíticos, no que diz respeito às encefalomyelites pós-infecciosas consideram que a substância nervosa homóloga alterada por um processo infeccioso se poderia tornar antigénica – o primeiro passo para a admissão da natureza autoimune subjacente a estas patologias (106).

3. Anafilaxia, alergia e autoimunidade. A evolução do modelo de Encefalomyelite Autoimune Experimental e a utilização de adjuvantes. A EAE como doença mediada por hiperimunidade celular.

O contributo da reacção imune na geração de danos neuropatológicos vinha, igualmente, sendo abordado no contexto de reacções anafiláticas, para além das experiências de imunização e vacinação acima descritas. De facto, no início do Século, os trabalhos de DELEZENNE e, depois, do seu discípulo ARMAND-DELILLE, tinham demonstrado que era possível

desenvolver “soros neurotóxicos” por inoculação de cobaios com emulsões de encéfalo de coelho, e que a administração intracerebral, em coelhos, destes soros levava ao aparecimento de paralisia e convulsões, não acontecendo o mesmo pela injeção intracerebral de soro fisiológico (107, 108). Os mesmos resultados tinham sido encontrados injectando encéfalo de cão em patos, e administrando o “soro neurotóxico” assim obtido a partir destas aves, intracerebralmente em cães (107), e foram, depois, confirmados por CENTANNI, injectando encéfalo de coelho em cordeiros (citado em (108)), bem como por ARMAND-DELILLE inoculando cérebro de cão em gansos, patos, carneiros, coelhos e cobaios (108). Este último autor descreve, igualmente, os achados neuropatológicos encontrados, e reporta a existência macroscópica de uma marcada congestão vascular, com hemorragias disseminadas, e microscopicamente, para além do referido estado congestivo, múltiplas hemorragias intersticiais e infiltrados leucocitários (compostos sobretudo de células polimorfonucleares) no parênquima encefálico e nas meninges, interpretados pelo autor como uma manifestação do “[...] phénomène d’appel leucocytaire que produit l’introduction de toute substance, non pas indifférente, mais nocive, pour l’organisme” (108). Esta reacção imune local, acompanhada de vasocongestão e hemorragia, configura o que mais tarde se veio a chamar reacção de hipersensibilidade do tipo ARTHUS (tipo III).

Na mesma linha, DAVIDOFF, SEEGAL e SEEGAL demonstraram a indução de reacções anafiláticas do tipo Arthus no encéfalo de coelhos injectados repetidamente com antigénios heterólogos (soro, albumina, eritrócitos), tendo estes animais demonstrado sinais de paralisia contralateral ao lado da injeção e convulsões, correspondendo, histologicamente, a lesões com edema, hemorragia e infiltrados leucocitários (109). ALEXANDER e CAMPBELL confirmariam estes dados pouco tempo depois através da injeção sistémica de soro de cavalo em cobaios, seguida de uma injeção intracerebral do antigénio (citados em (110)). A análise detalhada das alterações neuropatológicas provocadas por este tipo de indução experimental de anafilaxia cerebral, só viria a ser feita mais tarde por JERVIS, FERRARO, KOPELOFF e KOPELOFF (1941). Estes autores

encontraram, para além das alterações típicas do fenómeno de ARTHUS no local de injeção do antígeno, lesões à distância, disseminadas em todo o encéfalo, consistindo de pequenos focos de desmielinização perivascular com infiltrados celulares acompanhantes, consideradas como muito semelhantes às produzidas nas experiências de RIVERS e FERRARO (110). Tal como para estas últimas, a sua génese foi atribuída a uma reacção antígeno-anticorpo; a injeção local de proteínas heterólogas, no contexto da provocação de uma reacção hipersensível do tipo ARTHUS, libertaria antígenos de mielina que, comportando-se como haptenos e associados à proteína heteróloga como portadora, desencadeariam uma reacção imune com produção de anticorpos específicos. Estes, por sua vez, iriam induzir reacções antígeno-anticorpo à distância, reagindo contra os antígenos-alvo da mielina (110).

A constatação de que a presença de anticorpos na circulação cerebral tinha capacidade patogénica já tinha sido demonstrada por FORSSMAN (1920) após a injeção de soro contendo anticorpos FORSSMAN na artéria carótida de cobaias (citado por (111)). Este “síndrome carotídeo” de FORSSMAN, consistindo de desequilíbrio, movimentos rotatórios, desvio tónico do olhar e nistagmo era presumivelmente provocado por uma reacção antígeno-anticorpo (existindo antígeno FORSSMAN normalmente no sistema nervoso) ocorrendo no tronco cerebral. O antígeno FORSSMAN é capaz de induzir a produção de anticorpos hemolíticos anti-eritrócitos de carneiro em várias espécies; descoberto, originalmente, no rim de cobaia, é um polissacárido que se sabe, hoje, corresponder ao receptor de glicanos Gb5 (globopentaosilceramido). A presença deste antígeno no endotélio vascular leva a que a reacção antígeno-anticorpo FORSSMAN gere uma vasculopatia imune capaz de produzir choque por vasculite sistémica e vasculite hemorrágica cutânea (112). As características neuropatológicas das lesões provocadas no “síndrome carotídeo de FORSSMAN” foram estudadas por JERVIS (1943) (111). As lesões encontradas tinham um carácter vascular inicial, com lesão do endotélio e quebra da barreira hemato-encefálica, seguida, em alguns casos, por lesões parenquimatosas com características

desmielinizantes e inflamatórias perivasculares, semelhantes às obtidas na EAE (111). Como tal, o que JERVIS demonstrou desta forma foi que a síndrome de FORSSMAN era uma vasculopatia experimental por lesão imune do endotélio; os seus resultados devem, como tal, ser interpretados como uma prova-de-conceito (inovadora na altura) que a activação do sistema imune, actuando através de uma reacção antigénio-anticorpo local, é capaz de lesar o Sistema Nervoso Central, mesmo se, como agora sabemos, o antigénio não pertença, propriamente, à substância nervosa ela própria. No entanto, os seus resultados têm, também, sido apontados, até mesmo recentemente, pelos defensores da teoria tóxica-vascular, como prova conceptual de que é possível reproduzir os achados patológicos das doenças desmielinizantes humanas, e os da EAE, sem ser necessário postular um ataque antigénio-específico do Sistema Imune aos componentes da mielina do SNC (113).

Tentando sumarizar o ponto da situação no que dizia respeito à interpretação dos dados neuropatológicos provenientes quer do estudo das doenças desmielinizantes primárias, pós-infecciosas e pós-vacinais no ser humano, bem como dos estudos experimentais que acima delineámos, Armando FERRARO (1944), num trabalho de síntese notável, baseado não só numa extensa revisão da bibliografia, mas, também, nos seus trabalhos experimentais e clínicos, propõe que a base comum para a interpretação das alterações patológicas encontradas neste grupo diverso de patologias seria considerá-las como reacções alérgicas no encéfalo (114). Considerando, à vez, as diferentes teorias etiológicas então em voga (e que, resumidamente, descrevemos acima) – infecciosa, tóxica, lipolítica, vascular -, FERRARO junta, sob a mesma égide, os dados provenientes dos estudos neuropatológicos humanos, com os estudos experimentais da EAE de RIVERS e FERRARO, bem como os de anafilaxia cerebral de JERVIS. Comparando as características patológicas das doenças desmielinizantes primárias, as das reacções alérgicas experimentais (tais como as alterações cerebrais na anafilaxia sistémica e local), e as das lesões produzidas no modelo de RIVERS, no que diz respeito à presença de desmielinização,

hemorragias, envolvimento dos vasos sanguíneos, formação de trombos, distribuição, tipo e intensidade da reacção perivascular, presença de necrose e gliose, na opinião deste autor “[...] The similarity of the pathological changes associated with acute and chronic demyelinating diseases and the pathologic features of experimental anaphylaxis of the brain establishes [...] a definite analogy between the two processes” (114). As dificuldades e confusões habitualmente encontradas na literatura proviriam da fragmentação clínica e patológica artificial das doenças desmielinizantes (tal como referimos anteriormente), a falta de discriminação entre alterações patológicas agudas e crónicas, tendências individuais para categorizações dogmáticas das alterações patológicas em degenerativas ou inflamatórias, e a ausência de suporte experimental para a evolução das lesões agudas, inflamatórias, para crónicas e cicatriciais (114). Pelo menos esta última dificuldade poderia ser superada pelos modelos experimentais em desenvolvimento, que, de forma ainda mais importante “[...] will open new avenues to the interpretation of the pathogenesis and histogenesis of multiple sclerosis [...] and the acute encephalomyelitides” (114). Os modelos animais surgem, assim, não só como formas de reproduzir a patologia das doenças desmielinizantes; partindo da unicidade patológica proposta para as lesões desmielinizantes com base na reacção alérgica, a capacidade de reprodução das lesões implica, necessariamente, uma comunhão das suas causas e mecanismos, pelo que, através do estudo dos modelos animais, poder-se-ia chegar à compreensão das doenças humanas. Igualmente, esta interpretação alérgica da desmielinização “[...] would offer a new avenue of interpretation in the field of prevention and therapy of the important group of demyelinating diseases on an immunologic basis” (114) – o postulado inicial para qualquer tipo de terapêutica imunomoduladora, tal como as terapêuticas antigénio-específicas alvo do nosso trabalho. Inicialmente, no entanto, com base nesta interpretação alérgica, foram feitos ensaios terapêuticos com histamina, como, por exemplo, em Portugal por Diogo FURTADO e Vasco CHICHORRO, embora sem eficácia aparente (74).

A existência de uma reacção imune específica contra componentes do sistema nervoso tinha vindo a ser demonstrada com os trabalhos de BRANDT, GUTH e MULLER (1926) (101), e WITEBSKY e STEINFELD (1928) (102), que foram capazes de detectar anticorpos anti-substância nervosa, por testes de fixação de complemento e precipitação, em animais injectados com lípidos cerebrais conjuntamente com soro porcino, e com cérebro heterólogo, respectivamente. WITEBSKY demonstrou o aparecimento de um “antisoro” cerebral específico após imunização de coelhos com cérebro bovino, capaz de distinguir entre o cérebro e outros órgãos do mesmo animal, mas não entre o cérebro desta espécie e o de outras como o cobaio ou o rato, e que este soro reagia com um componente lipídico do encéfalo (102). Como vimos anteriormente, também SCHWENTKER e RIVERS (103), e LEWIS (104) tinham sido capazes de induzir uma resposta específica de anticorpos, e os primeiros tinham-na correlacionado com um provável componente presente na mielina madura do sistema nervoso central. No seguimento destes trabalhos, BAILEY e GARDNER confirmam a presença de uma reacção imune específica contra o cérebro, e capaz de gerar anafilaxia experimental, mas, sobretudo, que o antigénio associado à mielina poderia ser, em vez de um lípido, um polissacárido ou uma proteína (115), o que mais adiante seria fundamental.

A confirmação do papel do Sistema Imune na indução de lesões desmielinizantes, e a afirmação do modelo de Encefalomielite Alérgica Experimental de RIVERS, viria a ter uma nova sustentação sobretudo após a aplicação da técnica dos adjuvantes à imunização com extractos de substância nervosa. A constatação de que a indução de anticorpos contra um determinado antigénio não-tuberculoso era mais eficaz em cobaios concomitantemente infectados por tuberculose (116), e depois que o efeito poderia ser reproduzido pelo uso de micobactérias mortas como agente co-imunizador (117), culminou com a sua combinação com as técnicas de emulsificação água-em-óleo desenvolvidas e aperfeiçoadas por Jules FREUND, não só para fins de imunização, mas, também, para prolongar o efeito do produto biológico dessa forma inoculado (118, 119). Este aumento

de imunogenicidade obtido pela técnica adjuvante de FREUND, foi aproveitado por Lenore e Nicholas KOPELOFF para conseguir obter títulos significativos de anticorpos específicos anti-substância nervosa em macacos Rhesus imunizados com cérebro homólogo e heterólogo, uma evolução em relação ao que tinha sido alcançado, anteriormente, apenas em coelhos (120).

A aplicação da técnica adjuvante de FREUND aos modelos experimentais de desmielinização não se fez esperar: noutra ponta de viragem na história da investigação experimental das doenças desmielinizantes são publicados, concomitantemente, os trabalhos de Isabel MORGAN, e Elvin KABAT, Abner WOLF e Ada BEZER, em 1946, no *Journal of Experimental Medicine* (resultados preliminares tinham sido publicados no mesmo ano no *Journal of Bacteriology* e na revista *Science*, respectivamente). O que estes dois grupos, trabalhando separadamente, e partindo de intenções diversas, conseguem demonstrar, é que a conjugação das experiências de inoculação de substância nervosa de RIVERS com a técnica adjuvante de FREUND resultava numa melhoria substancial dos resultados, sendo necessárias muito menos injeções que anteriormente para obter o mesmo tipo de encefalomielite aguda disseminada, com lesões desmielinizantes e inflamatórias dispersas, e de forma muito mais reprodutível. Não é menosprezável o impacto deste díptico de artigos na história da EAE; não só se consegue, consistentemente, a obtenção de sinais clínicos e histológicos de doença neurológica (algo que, anteriormente, tinha sido difícil), mas sobretudo afirma-se, de forma inequívoca, que a activação não-específica do Sistema Imune por meio do adjuvante de FREUND contribuía, de forma significativa, para a génese das lesões desmielinizantes. Para além da identidade patológica com as doenças desmielinizantes humanas, já anteriormente afirmada, é dado o salto conceptual para uma etiopatogenia baseada numa reacção imune “alérgica”, ou “isoalérgica”, uma vez que se baseia na reactividade contra antígenos do próprio.

O trabalho de KABAT, WOLF e BEZER (121) vem na mesma linha dos trabalhos de RIVERS e FERRARO, e baseia-se, *a priori*, na hipótese em que a interacção entre a substância nervosa e os anticorpos anti-cérebro produzidos pela sua inoculação era central na patogénese deste modelo experimental, e que, como tal, o papel estimulador dos adjuvantes poderia potenciá-la. Utilizando emulsões de cérebro homólogo (macaco) e heterólogo (coelho) contendo *Mycobacterium tuberculosis* morto pelo calor, estes autores conseguiram induzir sinais clínicos e histológicos de desmielinização em 17 de 19 macacos Rhesus inoculados 3 a 5 vezes, em média cerca de 30 dias após o início da experiência (ao contrário dos 3 a 13 meses de RIVERS e FERRARO). É feita uma tentativa de transferência de soro, supostamente contendo anticorpos, de animais doentes para saudáveis, na tentativa de induzir desmielinização, mas sem sucesso. Histologicamente, quer no que diz respeito à distribuição, quer às características microscópicas, as lesões encontradas eram muito semelhantes às das encefalomyelites agudas humanas, e às formas agudas de Esclerose Múltipla, sobretudo pelo seu carácter desmielinizante, com relativa preservação axonal, bem como pela presença de lesões em várias fases de evolução (121). É igualmente estabelecida uma analogia com a então recentemente descrita leucoencefalite aguda hemorrágica de WESTON HURST (122), sendo esta comparada a uma forma extrema de encefalomyelite disseminada; posteriormente, uma forma de EAE hiperaguda viria a ser desenvolvida como modelo da doença de HURST (123). Neste trabalho afirma-se, claramente, o primado da etiologia imune das lesões desmielinizantes, com base na sua especificidade para o sistema nervoso (sendo a especificidade uma das características fundamentais da reacção imune adaptativa), no contributo dos adjuvantes, na localização perivascular consistente com a exposição a anticorpos presentes no sangue destes animais, e nas características histológicas das lesões que, em alguns casos, se assemelhavam a fenómenos de hipersensibilidade de tipo reacção de ARTHUS (121). A ausência de lesões vasculares noutros órgãos é apontada como um argumento contra a teoria trombogénica/vascular proposta por

outros autores. Por último, a demonstração feita pelo grupo de KABAT, mas igualmente por MORGAN, de que a utilização de cérebro homólogo era igualmente capaz de provocar idênticas lesões leva a que a “[...] autoimmunization as a possible mechanism in the production of comparable lesions in man must be considered” (121). Pela primeira vez, a possível natureza autoimune da Esclerose Múltipla estava a ser inequivocamente declarada; tal como FERRARO anteriormente, os autores propõem que nas encefalomyelites disseminadas, “[...] pathological changes brought about by the infecting virus or other causative agent, result in the liberation of brain tissue in a form which is both antigenic and can reach the sites of antibody formation” (121), uma proposição que é, ainda hoje, tida como verdadeira.

Num trabalho de seguimento, dedicado apenas à avaliação neuropatológica detalhada destes animais, os mesmos autores confirmam as semelhanças entre o quadro clínico de surtos e remissões, habitual na Esclerose Múltipla, e o observado nestas experiências; igualmente, é estabelecido um paralelo entre a existência de lesões desmielinizantes em várias fases de evolução, a sua distribuição predominantemente perivascular e a relativa ausência de danos axonais nesta patologia experimental, e nas doenças desmielinizantes humanas (124). Uma vez mais, a evolução rápida, quase fulminante em alguns casos, da doença experimental, é comparada à da leucoencefalite hemorrágica de HURST.

Dois outros trabalhos do mesmo grupo são publicados no ano seguinte, o primeiro dedicado à natureza do antigénio presente no sistema nervoso, e o segundo referente ao problema da autoimunidade. Baseando-se na hipótese de que a doença era provocada por uma reacção imune contra um antigénio presente na substância nervosa, o grupo de KABAT confirma a sua existência em vários animais (humano, macaco, coelho, e galinha), mas a sua ausência em peixes e répteis. Este elemento era resistente à fixação em formalina, aquecimento e ultra-sons, mas destrutível pela extracção por álcool; o mesmo paralelismo, já anteriormente encontrado por RIVERS, com o estado de mielinização do sistema nervoso, é confirmado no coelho (125). Tentativas de transferência passiva de doença por injeção endovenosa e

intracisternal de soro de animais doentes, ou por transferência celular de suspensões de baço e gânglio linfático por via intraperitoneal ou intramuscular, foram igualmente negativas, o que, mesmo na opinião destes autores, deixava no que diz respeito ao contributo do sistema imune “[...] a serious gap in the chain of evidence supporting this hypothesis that an antibody to the injected brain tissue reacts with the nervous system of the animal to produce the disease, since no positive evidence for such an antibody has yet been obtained” (125).

Desde essa altura, as numerosas tentativas realizadas, por estes e outros autores, de transferência passiva de EAE iriam resultar em fracasso, nomeadamente pela excessiva focalização no papel da resposta humoral, e pela ausência de formas de garantir a sobrevivência prolongada das células injectadas. Somente com o trabalho de Philip PATERSON iriam estas dificuldades ser vencidas, e, a partir desse momento, o papel dos linfócitos T adquiriu a importância central que lhes é hoje reconhecida (126). No que diz respeito à autoimunidade, haveria sempre a possibilidade, dadas as variações individuais mesmo dentro de cada espécie, de que a inoculação com encéfalo homólogo pudesse ser comparável à administração de antigénios não-próprios. Como tal, KABAT decide praticar lobectomias frontais em macacos Rhesus e, depois, imunizar animais individuais com emulsões de encéfalo e adjuvante preparadas a partir do seu próprio cérebro, obtendo desta forma sinais clínicos e histológicos de desmielinização (127). Estes resultados confirmaram, inequivocamente, que, dadas a condições certas de estimulação do sistema imune, era possível quebrar a tolerância contra antigénios do próprio, e induzir autoimunidade patogénica.

O trabalho de Isabel MORGAN parte de um pressuposto totalmente diferente: pretendendo a autora aumentar a imunogenicidade da vacinação contra o vírus da poliomielite em macacos Rhesus, confirma os resultados obtidos por KABAT. Após inoculação com medula espinhal de macaco infectada com o vírus, emulsificada com o adjuvante de FREUND na tentativa de induzir maiores títulos de anticorpos antivirais, ocorreram sinais de disfunção neurológica na maioria dos animais experimentais

(cegueira, nistagmo, ataxia e espasticidade), correlacionáveis com a existência de numerosas, extensas e disseminadas lesões inflamatórias e desmielinizantes perivenulares no encéfalo e medula espinhal (128). No seguimento destes resultados inesperados, tentou-se a imunização com emulsões de medula não infectada, tendo-se obtido os mesmos resultados, levando à conclusão que o fenómeno observado era devido a uma “[...] organ-specific isoimmunization in response to injection of central nervous tissue with adjuvants” (128). Temos aqui, portanto, uma demonstração independente do mesmo fenómeno, obtido por uma investigadora não directamente interessada na mesma área, e que reforça o conceito de que a estimulação do sistema imune por adjuvantes conseguia vencer a barreira da imunização contra antígenos do próprio. Tal como KABAT, MORGAN tenta a transferência de patogenicidade com soro de animais doentes, mas igualmente sem resultado. No mesmo ano, MORRISON aborda, novamente, a questão da isoimunização, desta vez utilizando como animal experimental o coelho, e consegue demonstrar, igualmente, a ocorrência de sinais clínicos e histológicos de encefalomielite inflamatória e desmielinizante, equiparados pelo autor aos encontrados na Esclerose Múltipla (129). Por sua vez, FREUND, STERN e PISANI fazem a mesma demonstração de autoimunização para o cobaio, utilizando cérebro homólogo e heterólogo (coelho), e embora não tenham conseguido encontrar desmielinização nesta espécie, relataram o aparecimento de sinais clínicos e histológicos idênticos aos descritos por outros autores (130).

JERVIS e KOPROWSKI, utilizando o mesmo animal experimental, obtiveram idênticos resultados após inoculação de cérebro de coelho, e relataram, de igual forma, uma relativa pobreza de lesões desmielinizantes, comparativamente a outras espécies (131). Mais tarde, a indução de formas experimentais de doença desmielinizante aguda, subaguda e crónica no ratinho albino foi conseguida por OLITSKY e YAGER (1949), após imunização com emulsões de cérebro homólogo com adjuvante (132). A susceptibilidade individual das diferentes estirpes de ratinho – “host factor” - à indução de doença é também, pela primeira vez, relatada por estes

autores, comparando a indução de doença em várias estirpes de ratinho, e classificando-as em susceptíveis (W-Swiss H-line, BSVS), parcialmente susceptíveis (BSVR, C3H) ou resistentes (W-Swiss B-line, Rockefeller Institute, BRVR, BRVS) (133). No que diz respeito à neuropatologia, tal como no cobaio, foi encontrada pouca evidência de desmielinização, embora no restante os dados fossem muito semelhantes aos anteriormente descritos em outras espécies (132). Na tentativa de melhorar o protocolo de indução de doença nesta espécie, o mesmo grupo introduziu a utilização de vacina de *Bordetella pertussis* como adjuvante, o que resultou num aumento de incidência e gravidade da doença (134). A utilização deste novo adjuvante viria a tornar-se uma parte fundamental do protocolo de indução de doença em ratinhos, até mesmo em estirpes mais resistentes à doença, havendo uma relação directa entre a eficácia da indução e a concentração da vacina (135). Por último, a indução de doença em ratos foi conseguida por LIPTON e FREUND após imunização de ratos albinos com medula espinhal homóloga e adjuvantes (136).

A questão, levantada pela maioria dos investigadores nesta área, referente às semelhanças neuropatológicas entre os modelos experimentais e as doenças desmielinizantes humanas, nomeadamente no que diz respeito à ausência de esclerose e gliose, por comparação com as abundantes lesões inflamatórias encontradas, viria a ser abordada também nesta altura por FERRARO e CAZZULLO (137). Utilizando doses menores de antigénio e de adjuvante para a imunização, a sobrevida dos animais experimentais – macacos Rhesus - foi prolongada até 3 meses após o início dos seus sintomas, ao longo dos quais ocorreram episódios de recrudescimento neurológico. Histologicamente, e apesar de continuar a observar-se uma reacção inflamatória crónica, foram detectados sinais de hipertrofia glial e a formação de cicatrizes glióticas, comparáveis com as observadas na Esclerose Múltipla, embora em menor grau (137). A relevância deste trabalho consiste na demonstração de que na resolução do processo inflamatório agudo resultante da activação do sistema imune, haveria uma transição para um processo de cicatrização gliótica, capaz, pelo menos em

teoria, de gerar as lesões escleróticas típicas das doenças desmielinizantes crónicas humanas. A ocorrência de gliose não viria a ser confirmada no modelo de encefalomielite crónica induzida em cobaios por imunização com substância nervosa homóloga emulsionada com uma variante de micobactéria menos patogénica (*Mycobacterium butyricum*), apesar da presença de desmielinização crónica (138).

Apesar de tudo o que foi acima descrito, não se deve considerar que, quer a atribuição da etiologia alérgica/autoimune às doenças desmielinizantes experimentais, quer a sua analogia com as doenças desmielinizantes humanas, fossem conceitos consensuais. Como ilustração desse facto, devem ser citados os trabalhos de LUMSDEN publicados em 1949 na revista *Brain*. Este autor produziu extensas observações utilizando cobaios, ratos e coelhos, empregando técnicas de indução de doença com e sem adjuvante, e estudos clínicos e neuropatológicos detalhados; consegue reproduzir a ocorrência de sinais clínicos e histológicos de doença, embora não concorde com o seu carácter inflamatório, achando apenas “[...] a curious and profuse proliferation of adventitial cells; partial softening of the immediately perivenular parenchyma, expressing itself in myelin preparations as a zone of demyelination [...] microglial proliferation in the immediately perivenular parenchyma” (139). No que diz respeito ao significado destas lesões experimentais, embora o autor concorde que se tenham reproduzido as principais características das encefalomielites pós-vacinais ou pós-exantemáticas, “[...] Whether the experimentalist has succeeded in reproducing disseminated sclerosis is a totally different question [...] it is my personal opinion that we have not [done so]” (139). Também no que diz respeito à etiologia das lesões o autor afirma que “[...] implicit in most of the published work on this experimental lesion has been the assumption that the reaction in an “allergic” phenomenon [...] this assumption [...] at the moment, is possibly not valid” (139). Estas conclusões são baseadas numa presumida separação entre os efeitos de sensibilização-anafilaxia, e os efeitos encefalitogénicos da imunização, na observação de que a presença de anticorpos anti-cerebrais não induz, necessariamente,

desmielinização, e, por último, na estabilidade química do antigénio capaz de sobreviver a vários tipos de processos de extracção. Na opinião de LUMSDEN, e dadas as analogias com as encefalomyelites pós-exantemáticas, o antigénio poderia até nem pertencer ao tecido nervoso, podendo, mesmo, ser derivado das lesões cutâneas do exantema (numa clara negação de todo o trabalho experimental acima descrito)^f. Num trabalho subsequente deste mesmo autor, esta hipótese não foi confirmada, mas, com base em experiências realizadas com imunização com e sem adjuvante, atribuem-se os efeitos imunológicos obtidos pelos outros investigadores aos efeitos não-específicos dos adjuvantes, por oposição a uma reacção antigénio-específica contra um encefalitogénio presente na mielina (140). As mesmas reservas em relação aos modelos experimentais foram expressas por STEVENSON e ALVORD (141), que concluem que “[...] Experimentally, a meningoencephalomyelitis, sometimes with disseminated foci of demyelination, can be produced in ways strongly suggestive that allergy is important [...] there is no evidence that a picture comparable to classic chronic multiple sclerosis has been reproduced experimentally”.

Do que foi dito anteriormente, parece ficar claro que, apesar de todas as evidências indirectas que implicavam o sistema imune na etiopatogénese da EAE, não tinha sido possível, ainda, demonstrar, inequivocamente, a sua contribuição fundamental para este processo. A geração de anticorpos contra componentes da substância nervosa tinha sido comprovada por vários autores, desde as experiências iniciais de GUTH, WITEBSKY e dos KOPELOFF, mas várias tentativas de transferência da doença por administração destes anticorpos tinham falhado (103, 125, 128). O trabalho de THOMAS, PATERSON e SMITHWICK de indução de EAE em cães com extractos de cérebro homólogo, apesar de conseguir localizar o componente encefalitogénico do cérebro a uma fracção não-saponificável dos extractos álcool-solúveis da substância branca, não conseguiu encontrar qualquer

^f Citando o autor: “[...] it is an attractive hypothesis that this [...] lesion is due [...] to some chemical derivative of the skin rash. [...] if may be possible to extract from the skin the same, or a similar, encephalitogenic factor as is present in the brain and in the peripheral nerves”.

relação entre os títulos de anticorpos fixadores de complemento e o aparecimento de sinais clínicos de doença, e põe, mesmo, em causa, a participação deste tipo de reacção imune na etiologia da EAE (142). O fraccionamento da substância nervosa, na tentativa de encontrar o componente encefalitogénico – adiante discutida em mais detalhe – era vista como uma forma eventual de superar as dificuldades de correlação entre o aparecimento de anticorpos e a desmielinização; a utilização de fracções com maior potência encefalitogénica poderia, eventualmente, induzir uma resposta imune mais significativa.

Baseados nessa hipótese, KIBLER e BARNES induziram EAE em coelhos utilizando uma fracção hidrossolúvel de substância nervosa, extraída com citrato de sódio em pH ácido (composta, como tal, predominantemente, de proteínas básicas), e conseguiram, através de técnicas de medição de anticorpos mais sensíveis (precipitação com sulfato de amónia), uma melhor correlação do aparecimento de anticorpos com a doença (143). Mais dados a favor do papel dos anticorpos na génese das doenças desmielinizantes foram dados pela detecção de níveis aumentados de síntese *in vitro* de IgG e IgA por células linfocitárias derivadas do líquido cefalorraquidiano de doentes com Esclerose Múltipla (144). Por outro lado, a utilização de modelos de desmielinização *in vitro* por BORNSTEIN e APPEL, com base em culturas de cerebelo neonatal de rato expostas a soro de animais com EAE, permitiu demonstrar, inequivocamente, o potencial patogénico de um componente deste soro, que se veio a comprovar ser uma imunoglobulina fixadora de complemento (145-147), segregada por células do sistema imune (148). No entanto, a determinação da especificidade desta imunoglobulina, que se descobriu ser contra um componente da mielina que não o principal encefalitogénio, veio, uma vez mais, gorar a tentativa de correlação incontroversa entre a resposta imune humoral e o aparecimento de desmielinização *in vivo* (149).

As dificuldades encontradas, durante muito tempo, por todos estes investigadores, em confirmar o contributo do sistema imune foram devidas – com o benefício da visão histórica *a posteriori* – à excessiva focalização na

resposta imune humoral; diga-se, igualmente, em boa justiça, que o próprio desenvolvimento técnico da imunologia só permitiu empreender estudos da resposta celular mais tardiamente. A prova directa da etiologia imune da EAE veio dos estudos de transferência celular adoptiva realizados por PATERSON e STONE no princípio dos anos sessenta, que comprovaram que esta doença, com todos os seus elementos clínicos, neuropatológicos e imunológicos podia ser transferida para recipientes normais através de células de gânglio linfático de dadores sensibilizados contra antigénios de mielina. Segundo Philip PATERSON (150), três passos fundamentais tiveram de ser dados para o sucesso das experiências de transferência celular adoptiva de EAE. Em primeiro lugar, a confirmação da importância do timo e dos gânglios linfáticos na génese desta doença. Enquanto que a extirpação cirúrgica dos locais de inoculação de encefalitogénio não era capazes de prevenir o aparecimento de EAE, a extirpação dos gânglios linfáticos de drenagem, até 5 dias após a inoculação, mas não depois, eliminavam, completamente, a doença (citado em (150)). Por outro lado, experiências de timectomia neonatal em ratos confirmaram que a ausência de timo e dos linfócitos daí derivados suprimiam, completamente, a capacidade dos animais adultos desenvolverem EAE (151). Em segundo lugar, a demonstração “landmark”, por LIPTON e FREUND, de que a EAE podia ser transferida entre dois animais colocados em parabiose. A indução de doença pelos processos clássicos num dos animais experimentais resultou no aparecimento de sinais clínicos de EAE no seu parabionte, demonstrando que a EAE era uma doença transferível por algum elemento do sistema imune presente na corrente sanguínea, fosse ele humoral ou celular (152). O terceiro passo, dado por PATERSON e STONE, consistiu em transferências adoptivas de EAE através de células derivadas do baço e gânglios linfáticos de animais imunizados com substância nervosa. A falência deste tipo de experiência, conforme tinha sido executada até então, poderia ser devida à não sobrevivência das células transferidas a partir de um dador sensibilizado para um receptor *naive*; dadas as diferenças de histocompatibilidade entre dadores da mesma espécie, as células

transferidas seriam eliminadas, rapidamente, da corrente sanguínea, não chegando a ter tempo de provocar danos no Sistema Nervoso.

De forma a evitar este fenómeno, Philip PATERSON, não dispendo, ainda, de estirpes endogâmicas isohistogénicas de rato sem problemas de histocompatibilidade, empregou uma técnica de tolerização imunológica desenvolvida recentemente: os recipientes foram tratados, neonatalmente, com esplenócitos normais dos futuros dadores. Na idade adulta, os dadores foram imunizados com medula espinhal, e 7 a 12 dias depois, suspensões de células (entre 10 a 156 milhões de células viáveis) derivadas dos gânglios linfáticos de drenagem do local de inoculação foram injectadas por via endovenosa ou intraperitoneal nos recipientes tolerizados, e assistiu-se ao aparecimento de sinais clínicos e neuropatológicos de EAE, idênticos em tudo aos encontráveis por indução directa da doença (153). Confirmando a necessidade de histocompatibilidade para o sucesso da experiência, a transferência de células de dadores para os quais os receptores não tinham sido directamente tolerizados resultou numa eficácia muito inferior (153). Na mesma linha de raciocínio, o trabalho de Sanford STONE com a estirpe endogâmica 13 Wright de cobaias, na qual se conseguia, facilmente, realizar a transferência de hipersensibilidade retardada, confirmou que através da inoculação intraperitoneal de suspensões de células de gânglio linfático de animais imunizados com emulsões de sistema nervoso homólogo, era possível transferir adoptivamente a EAE para recipientes da mesma estirpe, resultando numa doença grave e letal em muitos casos, com achados neuropatológicos característicos da EAE (154, 155). Utilizando a mesma técnica de transferência, FALK, KIES e ALVORD confirmaram os resultados de STONE, e, dada a ausência de anticorpos anti-mielina, na presença de reacções de hipersensibilidade cutânea contra o mesmo antígeno, reforçam a ideia da EAE como uma manifestação de hiperimunidade celular (156).

Pouco tempo depois desta demonstração, começaram a surgir, igualmente, dados provenientes de doentes com Esclerose Múltipla sobre a existência de reactividade linfocitária contra antígenos presentes na

substância nervosa. HASHEM e BARR descrevem a presença de um efeito mitogénico do componente nervoso da vacina anti-rábica sobre os linfócitos periféricos de doentes com formas agudas de Esclerose Múltipla (157), BEHAN *et al.* demonstram proliferação linfocitária contra proteínas encefalitogénicas da mielina em doentes com leucoencefalite hemorrágica e encefalomielite pós-infecciosa (158) e FOWLER faz o mesmo para células cultivadas na presença de LCR. Em outros casos, no entanto, este fenómeno não foi tão evidente, tal como nos trabalhos de HUGHES, CASPARY e FIELD (159) ou BRODY *et al.* (160).

Em resumo, em três décadas de investigação sobre a etiopatogenia da EAE, verificou-se uma evolução notável, paralela ao próprio desenvolvimento da Imunologia enquanto ciência, que levou de um conceito inicial vago de uma eventual reacção “alérgica” na qual o sistema nervoso seria lesado, para uma cada vez maior afirmação da especificidade da reacção imune anti-mielina, culminando no paradigma da EAE como exemplo de autoimunidade celular transferível entre animais experimentais. Por analogia de base fundamentalmente neuropatológica, as doenças desmielinizantes primárias e secundárias do humano são colocadas na mesma categoria nosológica de doenças imuno-mediadas, e a EAE assume o papel reconhecido de modelo experimental de eleição, facilmente reprodutível em várias espécies animais, que não só duplica muitas das características essenciais destas patologias, mas que serve, igualmente, como método para estudar os seus mecanismos etiológicos mais íntimos. Faltava somente, nesta progressiva anatomização do processo autoimune contra a mielina, identificar os elementos antigénicos responsáveis pelo desencadear da resposta imune, ou seja, o alvo molecular primário.

4. Estudos sobre o carácter antigénico da mielina. Do isolamento das fracções antigénicas à caracterização dos antígenos proteicos e a definição molecular dos determinantes antigénicos para cada espécie.

A par dos trabalhos anteriormente descritos, e que confirmaram o papel fundamental da resposta imune celular na génese da EAE, foram sendo desenvolvidos estudos no sentido de identificar o, ou os componentes antigénicos presentes na substância nervosa e responsáveis pelo desencadear de autoimunidade. Como vimos, desde o trabalho de SCHWENTKER e RIVERS em 1934 que o carácter antigénico da substância nervosa era relacionável com o seu conteúdo em mielina (103); no entanto, o método de preparação das emulsões utilizadas para imunização – extractos aquosos ou alcoólicos mais ou menos simples de cérebro ou medula espinhal – não permitia tirar conclusões sobre a identificação química dos potenciais componentes antigénicos. O aperfeiçoamento progressivo dos métodos de análise neuroquímica a partir da década de quarenta (a introdução de técnicas como a electroforese, a cromatografia, a ultracentrifugação, e as técnicas de extracção e análise lipídica) levou ao isolamento progressivo, por vários métodos de sub-fraccionamento da mielina, de vários componentes cuja actividade antigénica pode ser estudada (para uma extensa revisão da evolução destas técnicas, remetemos o leitor para o excelente trabalho de Armando SENA sobre o assunto (161)). Trabalhos iniciais como os de ALVORD ou de OLITSKY e TAL, dedicados a testar diluições dos extractos nervosos, ou utilizando técnicas de centrifugação simples (8000G) e dialização, comprovaram ser possível isolar a actividade encefalitogénica a fracções específicas da substância nervosa (132, 162). Dos estudos de indução de EAE previamente realizados, ficou aparente que o encefalitogénio era resistente à autólise, temperatura, autoclavagem, ultrasons, fixação com formalina, à lecitinase da toxina alfa do *Clostridium welchii*, mas que a extracção com etanol, acetona ou outros solventes orgânicos comuns, destruíam a sua actividade (125, 129, 132, 139).

O aperfeiçoamento de uma técnica de fraccionamento da substância branca, por um dos pioneiros da neuroquímica, Jordi FOLCH-PI, responsável pela identificação de vários componentes importantes da substância nervosa, como os gangliosídeos ou os sulfátidos (161), levou ao isolamento de um novo tipo de lipoproteína a partir da mielina denominado proteolípido, insolúvel em água mas solúvel em misturas de clorofórmio-metanol-água (163). Esta técnica de FOLCH e LEES consistia numa primeira homogeneização da substância branca em clorofórmio-metanol, seguida de separação do extracto clorofórmio-metanol. Este, por sua vez, era equilibrado com água resultando no aparecimento de três fases: superior (descartável), interface e inferior. A partir da interface, contendo elementos em suspensão, era possível isolar um primeiro precipitado - proteolípido A -, sendo que, do restante, após filtração e tratamento com acetona a 4°C, um segundo precipitado - proteolípido B -; da fase inferior, após secagem, eram realizadas extracções sucessivas com acetona, éter e etanol, resultando um resíduo insolúvel – proteolípido C (164). Este novo derivado da mielina foi inicialmente testado por OLITSKY e TAL na indução de EAE em ratinhos W-Swiss com cérebro homólogo, comprovando-se a capacidade encefalitogénica do proteolípido A e B (165); em trabalhos posteriores, os mesmos autores comprovaram estes resultados, estabelecendo uma relação entre a quantidade de proteolípido e a incidência de EAE, e negaram a antigenicidade das restantes fracções (166, 167). No entanto, num trabalho de Byron WAKSMAN (proveniente do laboratório de Marjorie LEES e Jordi FOLCH em Harvard), utilizando substância branca bovina para produzir EAE em coelhos, para além de se confirmar a importância do proteolípido A e B, ficou demonstrada a existência de antigenicidade na fracção éter-solúvel da fase inferior, atribuível à presença de contaminantes proteolipídicos, ou eventualmente à de um segundo antigénio não-lipídico (164). Mais ainda, a actividade antigénica por peso seco dos proteolípidos era menor do que a do cérebro fresco, e as curvas de dose resposta tinham um desnível diferente; estas diferenças poderiam ser atribuídas quer à inactivação do antigénio pelo processo de extracção, quer à existência de outros antigénios (164). A

juntar a estas incongruências, a demonstração de que nem todas as espécies eram sensíveis à imunização com este sub-componente da mielina levou ao seu progressivo descrédito como encefalitogénio, ficando apenas o mérito pioneiro de confirmar que a actividade antigénica da mielina era atribuível a um componente isolado desta substância (150). Mais tarde, como vimos no Capítulo anterior, este antigénio foi reabilitado, após a superação das dificuldades técnicas iniciais, com o isolamento da proteína proteolipídica, responsável pela sua encefalitogenicidade. Outra tentativa de isolamento do antigénio, por ROBOZ, HENDERSON e KIES, resultou na purificação de uma proteína de composição semelhante ao colagénio, e capacidade encefalitogénica em cobaios (168, 169), mas cuja raridade foi considerada como um factor impeditivo para um candidato ao papel de antigénio principal da mielina. Teve, no entanto, a virtude de provar que uma proteína purificada a partir da mielina poderia ter actividade encefalitogénica, o prelúdio para o isolamento das proteínas básicas (150).

O passo determinante para o isolamento do componente encefalitogénico principal da mielina foi o desenvolvimento de técnicas neuroquímicas de extracção de proteínas básicas. Ao contrário das subfracções anteriormente isoladas, as proteínas básicas purificadas exibiam uma capacidade encefalitogénica muito superior à da substância nervosa completa, em comparação por peso, confirmando tratar-se, provavelmente, do principal antigénio do Sistema Nervoso. Os trabalhos iniciais de LIPTON e STEIGMAN (1959), descreveram uma fracção solúvel em éter de petróleo, composta de 25 a 50% de proteína, isolada a partir de medula bovina e de cobaio, capaz de induzir EAE em quantidades de 2 a 5 microgramas (citados por PATERSON (150)). Posteriormente, outras técnicas de fraccionamento e purificação foram utilizadas para isolamento e concentração da proteína encefalitogénica. ROBOZ-EINSTEIN (1962), isolaram uma proteína básica a partir de medula bovina liofilizada, após remoção da fracção lipídica por extracção com éter de petróleo e acetona, com separações posteriores com água destilada e acetato de sódio, seguidas de extracção com cloreto de potássio e precipitação com sulfato de amónio e

electroforese (170). O grupo de LUMSDEN também reporta, nesta altura, o isolamento de um péptido dializável, obtido por extracção com cloreto de potássio e precipitação com sulfato de amónio em pH ácido, de uma proteína solúvel, não pertencente ao grupo das histonas, com capacidade encefalitogénica (171). A caracterização da composição amino-acídica, e do peso molecular dos factores encefalitogénicos presentes na “fracção de proteínas básicas” seria feita, mais tarde, pelo mesmo grupo, utilizando a técnica de filtração em gel em fenol-ácido acético-água (172, 173). KIES e ALVORD (a partir de 1959) aperfeiçoaram um processo de extracção por ácidos, resultando no isolamento de proteínas básicas encefalitogénicas de grande pureza e com o maior grau de encefalitogenicidade até então obtido. O procedimento de KIES consistia num primeiro passo de remoção lipídica com clorofórmio-metanol, seguida de uma separação de proteínas não-encefalitogénicas com água e cloreto de sódio e, por fim, uma extracção sequencial do resíduo com ácido hidrocloreico (0.01N); entre o pH 2.5 e 5 era possível extrair proteínas encefalitogénicas, precipitáveis com sulfato de amónio, dializáveis, liofilizáveis e armazenáveis a 4°C indefinidamente (174). A proteína extraída representava cerca de 1% do peso total inicial, e apenas 1 ou 2 microgramas em emulsão era capaz de induzir EAE em 50% dos animais, um aumento considerável da capacidade encefalitogénica; esta proteína era provavelmente idêntica à extraída pelo método de LIPTON e STEIGMAN, mas mais purificada (150). KIBLER, FOX e SHAPIRA reportam a purificação de uma proteína encefalitogénica de baixo peso molecular, a partir da medula bovina, utilizando uma homogeneização e extracção com acetona fria, seguida de extracção com citrato de sódio, ultracentrifugação, dialização e cromatografia em coluna (175). Um procedimento mais simplificado de extracção, desenvolvido por WOLFGRAM (1965) a partir do método de extracção com clorofórmio-metanol mas em pH ácido consistia, apenas, em permitir que suspensões de substância nervosa em clorofórmio-metanol equilibrassem, espontaneamente, com água durante a noite, a 4°C; o produto final era constituído inteiramente por proteína, com capacidade encefalitogénica, e a sua composição em amino ácidos era

idêntica à das proteínas isoladas pelos métodos de ROBOZ-EINSTEIN e KIES (176). Na mesma altura, CASPARY e FIELD (1965) foram capazes de isolar uma proteína encefalitogénica a partir de cérebro humano, utilizando um procedimento semelhante ao de KIES (177). O produto obtido foi analisado por fraccionamento em colunas de di-etil-amino-etil celulose, separação em colunas “Sephadex”, electroforese a vários pH, ultracentrifugação e espectroscopia UV; após indução de EAE com quantidades de 1 micrograma, testes de reactividade cutânea celular, e precipitação por dupla imunodifusão radial foram empregues para confirmar a geração de resposta imune em cobaios (177, 178). Anticorpos contra este factor encefalitogénico foram encontrados no soro de doentes com EM aguda e crónica, mas, também, no de doentes com neurosífilis e outras doenças neurológicas; não foi possível demonstrar hipersensibilidade cutânea contra este factor nestes doentes (179).

Esta proteína básica era notavelmente estável à temperatura, extracção com ácidos, fenol, precipitação com fenol e acetona, e precipitação com ácido pícrico; no seu estado natural, existiria provavelmente como um complexo proteolipídico, apesar de que, pelo processo de extracção clássico de FOLCH e LEES, não fosse possível isolá-la (150). A sua localização anatómica à mielina do Sistema Nervoso Central foi claramente demonstrada pelo trabalho de LAATSCH *et al.* que utilizaram ultracentrifugação isopícnica em gradiente de sucrose (30%) para isolar a partir da substância nervosa total a sua fracção mielínica, tendo de seguida purificado uma proteína básica a partir desta fracção pelo método de KIES, com a mesma capacidade encefalitogénica (180). A prova inequívoca da localização deste antigénio foi feita por RAUCH e RAFFEL (1964), que demonstraram, por imunofluorescência indirecta, que o soro de coelhos imunizados com proteína básica purificada reagia especificamente com a mielina na medula humana, bovina e de cobaio (181).

Os trabalhos provenientes destes vários grupos de investigadores não deixavam claro se todos eles estavam a isolar o mesmo antigénio, apesar da concordância sobre a sua caracterização como uma proteína básica catiónica

de baixo peso molecular. Mapas pépticos gerados por digestão tríptica seguida de uma combinação de electroforese e cromatografia a 2 dimensões, permitiram a NAKAO, DAVIS e ROBOZ-EINSTEIN fraccionar o componente de proteína básica da medula bovina, e seleccionar as fracções encefalitogénicas. A semelhança estrutural e molecular entre estas permitiu concluir tratarem-se de fragmentos da mesma macromolécula, degradada pelo processo de extracção (182). O isolamento e purificação desta proteína foi conseguido no final da década de sessenta por KIBLER e SHAPIRA, e EYLAR *et al.* trabalhando independentemente. Os primeiros utilizaram um processo de cromatografia em carboximetil-celulose de um extracto de citrato de sódio de medula bovina deslipidificada por extracção com acetona-éter, para isolar uma proteína encefalitogénica, de peso molecular entre 4000 e 8000 Daltons, caracterizada depois através de electroforese em gel de poliacrilamida, análise do conteúdo em aminoácidos, e parcialmente sequenciada na extremidade amino-terminal (183). EYLAR *et al.*, por sua vez, empregando um processo de extracção ácida, seguida de cromatografia em di-etil-amino-etil celulose e filtração em gel de ureia, conseguiram a purificação de uma grande quantidade de uma proteína encefalitogénica homogénea a partir de medula bovina, correspondendo a cerca de 30% do conteúdo proteico da mielina, a que chamaram proteína A1 (184). Esta proteína foi empregue na indução de EAE em cobaias, e após imunização gerou uma resposta humoral e celular importante e detectável (184). A proteólise que ocorre, naturalmente, com temperaturas acima de 4°C, e durante a liofilização, reduzia a eficácia dos processos de extracção, motivo pelo qual outros laboratórios não tinham conseguido rendimentos tão elevados; a abundância desta proteína pressupunha que desempenhasse um papel estrutural fundamental, como se veio depois a comprovar (161, 184). A sequência completa desta proteína no homem e bovino foi obtida pelo grupo de EYLAR através da sequenciação de péptidos parcelares, obtidos a partir da digestão enzimática por pepsina, tripsina e quimotripsina da proteína A1; no humano, a proteína é composta de 172 resíduos amino-acídicos, e tem

um peso molecular de 18,625 Daltons, enquanto que a proteína bovina tem 170 resíduos e 18,395 Daltons (185, 186).

No que diz respeito aos determinantes antigénicos específicos dentro desta proteína, o mesmo método de obtenção de péptidos parcelares por digestão enzimática foi utilizado para fraccionar a proteína A1 e identificar as sequências antigénicas para as várias espécies. Os trabalhos iniciais do grupo de HASHIM e EYLAR permitiram identificar dois péptidos – E e E1 – que eram mais potentes indutores de EAE que a proteína original em cobaios; ambos os péptidos continham, na sua sequência, o único resíduo de triptofano da proteína, correspondendo, portanto, à mesma região da molécula (187, 188). Estes trabalhos levaram, igualmente, à conclusão de que a estrutura secundária e terciária da proteína não eram necessárias para a indução da resposta imune, e de que a região antigénica era composta, meramente, por uma pequena sequência de aminoácidos (187). Mais tarde, foram testadas várias sequências peptídicas derivadas da sequência do péptido E, obtidas por síntese de fase sólida através do processo de MERRIFIELD (189, 190), e que permitiram definir a região antigénica mínima, composta de 9 aminoácidos (Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Lys, resíduos 112-122 da proteína total) rodeando o resíduo de triptofano (191); numa fase seguinte, péptidos de síntese com modificações de um único resíduo de cada vez foram empregues para definir um trio de aminoácidos (--Trp---Gln-Lys) essencial para a encefalitogenicidade (192), embora, posteriormente, tenha sido descoberto que os aminoácidos circundantes do resíduo triptofano fossem igualmente relevantes (193). Uma segunda região antigénica no cobaio foi descrita por BARTON *et al.* na região N-terminal (Gly-Ser-Lys-Trp-Leu-Ala-Thr-Ala-Ser-Thr), embora com fraca capacidade encefalitogénica (194). Paralelamente com os trabalhos do grupo de EYLAR, a análise detalhada da proteína descrita por KIBLER e SHAPIRA (183) confirmou que a sequência obtida por estes autores correspondia, apenas, a um segmento parcial da proteína básica total, mas o facto de conter um determinante encefalitogénico de sequência diferente dos péptidos de EYLAR (e para uma espécie diferente, uma vez que o péptido de

KIBLER era antigénico em coelhos, enquanto que a sequência de EYLAR era-o em cobaias) apontava para a existência de mais do que uma região antigénica na proteína A1 (195, 196). Esta sequência, contida entre as duas repetições Phe-Phe da proteína A1 (resíduos 45 a 90 da sequência bovina) foi analisada, de forma idêntica, à procura do determinante antigénico, através de digestão enzimática e síntese de péptidos, resultando no isolamento de uma sequência de 10 aminoácidos (Thr-Thr-His-Tyr-Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys) com algumas semelhanças estereoquímicas (resíduo aromático – Trp ou Tyr – seguido de glicina e terminal carboxi glutaminil-lisina) com a encontrada por EYLAR (197). No que diz respeito aos primatas, foram testados por EYLAR quatro péptidos diferentes derivados da proteína A1: péptido T (resíduos 116-170), P14 (134-170), T18 (114-120, contendo a região triptofano) e R (44-89, contendo a região de KIBLER). Destes, somente os péptidos T e P14 eram encefalitogénicos no macaco Rhesus, apontando ainda para uma quarta região antigénica na proteína A1 (198).

O problema da determinação da sequência antigénica no rato só mais tarde foi resolvido. Os resultados iniciais de MCFARLIN apontavam para uma maior susceptibilidade da estirpe Lewis à proteína básica de cobaio e, dentro desta, à região de KIBLER (péptido R de EYLAR) (199, 200). CHOU *et al.*, e depois KIBLER *et al.*, mostraram que um fragmento da proteína básica de cobaio – resíduos 68-88 – tinha a mesma capacidade encefalitogénica que a proteína total, e induzia fortes respostas celulares e humorais em ratos Lewis (201, 202). No seu seguimento, HASHIM, utilizando péptidos de síntese, confirmou a localização do determinante antigénico principal para esta espécie à sequência bovina 69-84 (Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ala-Gln-Gly-His-Arg-Pro-Gln-Asp-Glu-Asn), e explicou as diferenças de maior potência antigénica da proteína de cobaio em relação à de rato, com base em duas modificações nesta sequência (deleção dos resíduos 77-78 – Gly-His) (203, 204). A progressiva delimitação do epítopo contido nesta sequência foi feita primeiro por CHOU *et al.*, por clivagem enzimática sequencial do término amino, tendo estes autores concluído que o determinante antigénico estava contido na sequência 71-85 (205).

Utilizando péptidos sintéticos, MANNIE *et al.* estudaram a capacidade de indução de respostas linfocitárias, indução de EAE e transferência adoptiva após imunização com várias sequências, incluindo a proteína básica de cobaio, as sequências 68-84 de cobaio e bovina (com as modificações 75S>A, 78S>P), e as sequências de cobaio 75-84 e 75-86. Dos resultados, estes autores concluem que a região amino-terminal deste péptido era mais relevante que o pensado por CHOU, e que a sequência antigénica estava contida entre os resíduos 68-74 (206).

No que diz respeito ao ratinho, a relativa dificuldade de indução de EAE nesta espécie foi uma barreira só mais tardiamente ultrapassada, sobretudo a partir do momento em que se tornaram disponíveis estirpes endogâmicas singénicas. Os trabalhos iniciais de OLITSKY (132) na década de 1940-50 foram, sobretudo, ampliados a partir dos anos 70 com os trabalhos de LEVINE, BERNARD, LUBLIN, BROWN e FRITZ (135, 207-211). Estes autores estabeleceram a possibilidade de indução de formas de EAE aguda e crónica com surtos em ratinhos, utilizando homogeneizado de medula espinhal e proteína básica de mielina (207). Particularmente importantes foram a utilização da toxina de *Bordetella pertussis* como adjuvante à imunização em várias estirpes (212), bem como os protocolos de combinação de transferência adoptiva e reforço antigénico para induzir EAE em estirpes de ratinho tradicionalmente consideradas resistentes (213).

Do ponto de vista imunológico, o ratinho tinha assumido, progressivamente, um papel mais relevante na investigação imunológica, com uma caracterização cada vez mais pormenorizada dos elementos responsáveis pela sua resposta imune. Como tal, a criação de um modelo reprodutível de EAE nesta espécie abria a possibilidade de se estudar, aprofundadamente, a resposta encefalitogénica, nos seus elementos celulares e humorais. Na sequência dos estudos iniciais, PETINELLI e MCFARLIN demonstraram a possibilidade de indução de EAE em 100% dos animais da estirpe SJL, após transferência adoptiva de células de gânglio linfático de animais imunizados com proteína básica de rato, e que este fenómeno era dependente da presença de linfócitos T (214). Posteriormente,

estes autores estudaram a localização da região antigénica para esta estirpe, utilizando a proteína básica de coelho, bem como os péptidos 1-37, 43-88 e 89-169 obtidos por digestão enzimática. Destes apenas o péptido proveniente da região C-terminal (89-169) tinha capacidade encefalitogénica (215). No que diz respeito a outras estirpes de ratinho susceptíveis, FRITZ, CHOU e MCFARLIN observaram que, para a estirpe PL/J, a região antigénica era totalmente distinta, estando contida na sequência 1-37 (210). Na sequência deste trabalho, e empregando as técnicas, recentemente desenvolvidas, de isolamento e caracterização de clones linfocitários (discutidas adiante), ZAMVIL *et al.* examinaram a especificidade da resposta linfocitária dentro desta região, identificaram a região antigénica para esta estirpe como sendo a sequência AcMBP1-11 (contendo um resíduo acetil no seu N-terminal), bem como a restrição da resposta imune destes clones ao gene MHC classe II, I-A^u, uma vez que a imunização de estirpes com genes I-A^s (e.g. SJL) não induzia resposta linfocitária (216, 217). Utilizando a mesma técnica, o mesmo grupo foi capaz de identificar o determinante encefalitogénico major da MBP para a estirpe SJL/J, neste caso a sequência 89-101, bem como a sua restrição ao antígeno I-A^s (218). Concomitantemente, KONO *et al.*, estudando a mesma estirpe identificaram, dentro da sequência MBP89-104, dois determinantes antigénicos diferentes (MBP87-98 e 91-104), um dos quais (87-98) com excelente capacidade encefalitogénica (219). Por último, uma terceira região encefalitogénica dentro da MBP, para a estirpe cruzada SJL/JxPL/J F1, foi identificada por ZAMVIL e STEINMAN. Esta sequência (MBP35-74) tinha a particularidade de ser restrita ao locus I-E (E α^u E β^s), correspondendo ao locus humano HLA-DR, epidemiologicamente associado à Esclerose Múltipla em várias populações (enquanto que os anteriores I-A são homólogos do locus HLA-DQ) (220).

A facilidade de utilização do ratinho como animal experimental neste modelo, bem como os desenvolvimentos na Neuroquímica e Imunologia abriram, de imediato, as portas à identificação de outras moléculas componentes da mielina com capacidade encefalitogénica. Exemplos disso foram os estudos que levaram à caracterização de um segundo alvo

antigénico, a proteína proteolipídica (PLP). Inicialmente isolados por FOLCH e LEES (163), e empregues por OLITSKY e TAL, e por WAKSMAN para a indução de EAE (164-166), os proteolípidos foram depois abandonados em virtude da sua baixa encefalitogenicidade, em benefício das proteínas básicas, conforme anteriormente descrevemos. A partir dos anos 1980, no entanto, vários trabalhos foram publicados, confirmando a possibilidade de indução de EAE em coelhos, cobaias, ratos e ratinhos com a proteína proteolipídica (221-231). Inicialmente, estes resultados foram postos em causa, sobretudo pela eventual presença de contaminações com proteínas básicas nos extractos proteolipídicos utilizados, mas os resultados dos grupos de MACKLIN e Takeshi TABIRA, empregando PLP muito purificada, confirmaram o carácter antigénico desta proteína (223, 224, 228, 229). Igualmente, após sub-fraccionamento dos proteolípidos nas proteínas PLP major e isoforma DM-20 através de electroforese e *immunoblotting*, foi possível confirmar a ausência de contaminação por MBP; estas subfracções foram capazes, elas próprias, de induzir EAE em ratinhos Balb/c (230). Por último, a transferência adoptiva de linhas celulares T específicas para a PLP e DM-20 foi, só por si, suficiente para induzir doença em ratinhos SJL com todas as características clínicas e histológicas da EAE, confirmando, assim, que na ausência de qualquer possível contaminação com MBP, a proteína proteolipídica era um importante antigénio (231).

Não só esta proteína mostrou ser encefalitogénica em várias estirpes de ratinho com diferentes tipos de loci I-A (SJL/J (H-2^s), DBA/1J (H-2^q), CBA/J (H-2^k), Balb/cJ (H-2^d)) (232), mas a análise pormenorizada dos aspectos neuropatológicos da EAE induzida com esta proteína confirmou as semelhanças com a EAE induzida pelos métodos clássicos, bem como com a Esclerose Múltipla (225). De seguida, o estudo dos determinantes antigénicos nesta proteína foi rapidamente efectuado pelo grupo de Marjorie LEES; inicialmente, TUOHY *et al.*, utilizando péptidos sintéticos correspondentes às principais regiões hidrofílicas da proteína, identificaram a sequência PLP103-116 para a estirpe SWR (233) e PLP139-151 para a estirpe SJL/J (234). Em ambos os casos, foi possível induzir respostas

linfocitárias proliferativas, e incidências elevadas de doença através de imunização com estes péptidos sintetizados artificialmente. A importância antigénica da sequência PLP139-151 na estirpe SJL/J foi confirmada pelo facto de que, mesmo após imunização com homogeneizado de medula espinhal (contendo todas as proteínas de mielina), só foi possível identificar proliferação linfocitária contra este péptido (235). Como tal, o carácter imunodominante deste epítipo para a estirpe SJL/J é manifestado pelo facto de que, apesar da existência de um epítipo encefalitogénico da MBP para esta estirpe (MBP89-101, identificado por SAKAI (218)), na presença do epítipo PLP139-151, a resposta imune é completamente enviesada no seu sentido. Um segundo determinante antigénico da PLP para esta estirpe, PLP178-191, foi posteriormente identificado, igualmente pelo grupo de LEES, e proposta a sua co-dominância com o PLP139-151 (236).

Um terceiro componente da mielina a ser caracterizado como encefalitogénico foi a glicoproteína oligodendrocítica da mielina (MOG), um componente quantitativamente menor da mielina do SNC, pertencendo à superfamília das imunoglobulinas, e com funções que incluem, provavelmente, a adesão celular, estabilização do aparelho microtubular e activação do complemento (237). A capacidade dos antisoros, desenvolvidos contra alguns componentes da mistura complexa de proteínas minor da mielina, presentes na fracção insolúvel em clorofórmio/metanol (CMIP), de induzirem efeitos desmielinizantes *in vitro*, levava a crer que existiria, para além da MBP e PLP, pelo menos um outro potencial encefalitogénio, uma vez que antisoros específicos para estas proteínas não tinham capacidade desmielinizante (238-241). Já anteriormente, desde 1976, LEBAR *et al.* tinham demonstrado a presença de anticorpos com capacidade de fixação de complemento e indução de desmielinização *in vitro*, reagindo contra um componente da mielina, denominado M2, ao invés da MBP ou PLP (242, 243) e identificado posteriormente como correspondendo a uma nova glicoproteína da mielina, denominada MOG por LININGTON (244). Algumas particularidades deste novo antigénio tornavam-no como um bom encefalitogénio primário para as doenças desmielinizantes, tal como revisto

por Claude BERNARD *et al.* (245): 1) a sua localização nas lamelas exteriores da membrana de mielina tornavam a MOG acessível à reacção imune humoral; 2) este antigénio era – ao contrário da MBP ou PLP – específico da mielina do SNC; 3) anticorpos anti-MOG purificados eram capazes de induzir desmielinização *in vitro* e *in vivo*, bem como de agravar os danos neuropatológicos encontrados na EAE induzida com MBP; 4) anticorpos anti-MOG eram detectáveis em animais com EAE crónica induzida com homogeneizados de tecido encefálico total; 5) a capacidade desmielinizante do soro de animais com EAE é proporcional ao título de anticorpos anti-MOG (245).

Foi possível induzir EAE por imunização com esta proteína em várias estirpes de ratinho com diferentes genes I-A, incluindo algumas tradicionalmente consideradas resistentes (Biozzi AB/H, SJL/J, PL/J, C57BL/6, C3H.SW, NOD/Lt) e no rato Lewis (245-253). A partir destes estudos, foi também possível identificar o epítipo dominante para a resposta imune, neste caso a sequência MOG35-55 (249-251, 253); embora a capacidade encefalitogénica deste epítipo fosse comparável à da proteína inteira, e induzisse uma resposta humoral muito intensa e específica, no que diz respeito à resposta T não foi possível confirmar o seu carácter imunodominante, i.e., após imunização com MOG completa, eram detectáveis respostas proliferativas contra vários epítipos, incluindo o MOG35-55 (revisto em (245)).

Igualmente interessante foi a constatação de que os achados neuropatológicos da EAE induzida com esta proteína replicavam várias características da Esclerose Múltipla, ao invés do que acontecia até então. Após imunização com MOG, mais do que as lesões inflamatórias descritas até então na EAE, era possível observar a existência de zonas de desmielinização idênticas às encontradas na EM (245, 254); mais ainda, a transferência adoptiva de anticorpos anti-MOG induzia lesões desmielinizantes (255-257). Clinicamente, era também possível induzir formas de doenças progressivas, para além das formas com surtos e remissões obtidas nos ratos Lewis ou ratinhos SJL (245). Por outro lado,

numa percentagem significativa dos animais experimentais era possível observar lesões desmielinizantes no cerebelo (12.9% em ratos DA), nervo óptico (2.86% em ratos BN), ou imitando o padrão da neuromielite óptica de DEVIC (36,5% em ratos DA e 77.14% em ratos BN) (254). Até então, os modelos de EAE replicavam, sobretudo, quadros de mielite transversa ascendente, mas a indução de doença com MOG permitia reproduzir um dos achados clínicos mais frequentes nas doenças desmielinizantes, nomeadamente o atingimento do nervo óptico (254). Por último, através deste antigénio foi possível gerar pela primeira vez, no laboratório de Steve HAUSER, um modelo experimental de doença desmielinizante no primata não-humano *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco, ou mico-comum) com características patológicas muito semelhantes à EM, e no qual as sinergias patogénicas entre linfócitos T e anticorpos anti-MOG eram claramente evidentes (258-260).

Como vimos no capítulo anterior, a estes três antigénios considerados, habitualmente, como mais importantes, vieram, ao longo dos anos, a juntar-se uma lista progressiva de outros componentes menores da mielina, com capacidade encefalitogénica em modelos animais, mas com papel menos bem definido na Esclerose Múltipla (261). Mais ainda, em anos mais recentes, foi reconhecido, também, o contributo de outros antigénios não-proteicos, como sejam os lípidos presentes na mielina (262, 263). Está para além deste trabalho uma explanação detalhada da descoberta de todos estes antigénios potenciais, mas fica a constatação de que, à complexidade estrutural da mielina, e da sua composição neuroquímica, se associa uma complexidade imunológica igualmente espantosa, sendo possível encontrar reacções imunes contra uma diversidade dos seus componentes, algumas das quais com potencial relevância para as doenças desmielinizantes. À *naiveté* inicial dos investigadores que se propunham descobrir “ein Gift des Nervensubstanz” (93), o agente encefalitogénico presente na mielina, vinha, progressivamente, a impor-se a constatação da diversidade e multiplicidade de alvos para a resposta imune, e a necessidade da sua caracterização fisiológica e molecular.

5. Da caracterização dos antígenos de mielina à identificação do complexo trimolecular nos modelos experimentais e na Esclerose Múltipla. A identificação de clones linfocitários anti-mielina e a restrição de repertório TCR. Modelos transgênicos de EAE espontânea.

Paralelamente à progressiva determinação dos epítomos antigénicos para o ratinho, surgiu a possibilidade de estudar, pormenorizadamente, a resposta linfocitária nesta espécie, fruto do desenvolvimento das técnicas de cultura celular *in vitro*, fenotipagem celular por citometria de fluxo, clonagem e sequenciação de genes, entre outras. Embora desde os anteriormente mencionados estudos de PATERSON (153), tivessem sido empregues técnicas de transferência adoptiva de EAE utilizando esplenócitos totais, ou células de gânglio linfático, foi somente no princípio da década de 1980 que foram progressivamente isolados os componentes celulares responsáveis pela transferência de doença. PETINELLI e MCFARLIN, e BEN-NUN, WEKERLE e COHEN foram os responsáveis pelo destacar do papel central do linfócito T na EAE; os primeiros, confirmaram a importância da população de linfócitos com fenótipo T_{helper} na EAE transferida por culturas de gânglio periférico em ratinhos (214), enquanto os segundos desenvolveram os procedimentos necessários ao estabelecimento *in vitro* de linhas celulares linfocitárias T anti-MBP de longa duração, capazes de transferir doença em ratos Lewis (264, 265). As propriedades encefalitogénicas das linhas celulares T em ratos Lewis foram confirmadas, posteriormente, por VANDENBARK *et al.*, no que diz respeito à sua persistência no hospedeiro, capacidade de transferência em série, especificidade para epítomos da MBP e encefalitogenicidade (266, 267).

Embora as experiências iniciais de transferência produzissem, apenas, EAE aguda, em breve foi possível demonstrar a indução de EAE crónica com surtos em ratinhos SJL após transferência de linhas celulares T anti-MBP (268, 269). A ocorrência de novos surtos clínicos, apesar da

ausência de antígeno injectado, levava a supor que durante o ataque imune contra a MBP, outros antígenos de mielina fossem libertados levando a uma resposta imune contra estes – uma forma precursora da hipótese da diversificação de epítomos (268, 269). No princípio da década de 1990, a EAE era vista como o modelo prototípico de doença autoimune mediada por linfócitos T CD4+ restritos a MHC classe II reagindo especificamente contra proteínas da mielina como a MBP, e produzindo citocinas pró-inflamatórias (fenótipo *T_{helper}-1*). ZAMVIL e STEINMAN, num extenso artigo de revisão escrito nesta altura explanam, claramente, todos os aspectos deste paradigma, desde o reconhecimento antigénico mediado por moléculas de MHC classe II que restringem o tipo de determinantes antigénicos apresentados (selecção do determinante), ao tipo de antígenos e epítomos para linfócitos T, estrutura e diversidade do receptor da célula T, e, igualmente, a necessidade de pré-activação dos clones auto-reactivos na periferia, fora do SNC, de forma a possibilitar a sua entrada para o parênquima encefálico (270). Baseando-se na especificidade da resposta imune, os autores abordam, também, a questão da imunoterapia selectiva baseada em anticorpos anti-MHC, anti-TCR ou com péptidos bloqueadores da interacção MHC-TCR – assunto que abordaremos, em maior detalhe, no próximo capítulo.

O aperfeiçoamento das técnicas de cultura celular, nomeadamente a capacidade de gerar clones linfocitários T por métodos de diluição limitante e expansão de clones individuais, veio novamente revolucionar o estudo da especificidade da resposta anti-mielina. Enquanto que as linhas celulares T constituem uma população heterogénea, policlonal, de células capazes de reagir contra vários antígenos, os clones linfocitários permitem uma identificação precisa das características das células encefalitogénicas. Neste campo, o grupo de Lawrence STEINMAN foi, sem dúvida, pioneiro. Num conjunto de trabalhos publicados a partir de 1985, Scott ZAMVIL, trabalhando no laboratório de STEINMAN, foi o primeiro a conseguir isolar e manter clones linfocitários T anti-MBP e a transferir adoptivamente EAE, em ratinhos PL/J e PLxSJL F1. Como vimos anteriormente, estes trabalhos

culminaram, na determinação dos epítomos da MBP para esta estirpe, bem como na restrição da sua resposta linfocitária a determinados alelos I-A (216, 271, 272), e na caracterização de clones anti-MBP na estirpe SJL (273). Igualmente, o estudo do receptor da célula T (TCR) em clones reactivos contra o epítipo AcMBP1-11, da estirpe PL/J, identificou, pela primeira vez, através de citometria de fluxo e análise molecular com sondas genéticas, uma restrição de repertório de reconhecimento linfocitário, sendo que a maioria dos clones utilizava uma cadeia V β 8.2 no seu TCR (274). O significado desta descoberta foi de que, pela primeira vez, tinha sido identificado um complexo trimolecular associado à EAE (I-A^u+AcMBP1-11+TCR V β 8.2) e que a encefalitogenicidade de um clone linfocitário estava associada à capacidade de reconhecimento de um determinado antigénio, determinada pelo seu tipo de receptor antigénico. A implicação imediata deste tipo de resultado, como veremos no capítulo seguinte, era de permitir formas de intervenção terapêutica especificamente desenhadas para interferir neste complexo e, como tal, impedir o aparecimento de doença. Aliás, neste mesmo trabalho, foi utilizado um anticorpo monoclonal específico contra o TCR V β patogénico, com sucesso na prevenção da EAE (274). Esta restrição V β , encontrada em clones seleccionados *in vitro*, foi, de seguida, confirmada a partir de populações linfocitárias *in vivo* de animais imunizados com AcMBP1-11. A sequenciação do TCR de clones linfocitários confirmou que todos utilizavam a mesma cadeia V α , e pelo menos 80% a mesma cadeia V β (V β 8); havia graus menores de restrição das regiões J α e J β , mas, apesar disso, a especificidade antigénica era mantida (275). Um trabalho fundamentalmente idêntico, realizado paralelamente pelo grupo de Leroy HOOD na estirpe B10.PL (H-2^u), confirmou os achados anteriores de restrição de repertório. Em todos os clones linfocitários T anti-MBP1-11 estudados, eram utilizados apenas 2 genes V α (V α 2.3 e 4.2), um gene J α (J α 39), e dois genes V β e J β (V β 8.2-J β 2.6 e V β 13-J β 2.2) (276). Este trabalho confirmou, igualmente, o potencial terapêutico de anticorpos anti-TCR na prevenção da EAE. O mesmo tipo de estudo de clones linfocitários T foi desenvolvido por KUCHROO, trabalhando no grupo de LEES, para o

epítipo PLP139-151 na estirpe SJL/J; neste caso, no entanto, a resposta linfocitária mostrou ser mais heterogênea, com utilização de vários genes V β no TCR (277). O facto de ser possível induzir doença nesta estirpe (I-A^s) com péptidos derivados quer da MBP, quer da PLP, poderia querer dizer, à partida, que a ausência de restrição se correlacionaria com esta capacidade de resposta mais abrangente. Como tal, KUCHROO *et al.* produziram ratinhos SJL transgénicos em que o repertório TCR era limitado pela introdução de um gene V β 8.2 rearranjado, e estudaram a capacidade de indução de EAE nestes animais, com ambas as proteínas. Saliente-se que este gene V β não pertence ao repertório normal desta estirpe, sendo eliminado durante os rearranjos V-D-J. Nestas experiências, manteve-se, apenas, a capacidade de resposta aos péptidos da PLP, desaparecendo a susceptibilidade à MBP, e foi demonstrado que o reconhecimento da PLP139-151 era claramente dependente da interacção V β 8.2-MHC através do seu bloqueio por anticorpos específicos (278). Ou seja, apesar de, normalmente, não estar presente no repertório TCR da estirpe SJL/J, a cadeia V β 8.2 do TCR estava associada, em mais do que um modelo animal, a clones T encefalitogénicos, salientando o seu potencial como alvo terapêutico. Finalmente, a resposta contra o antígeno MOG35-55 em ratinhos H-2^b (CH3.SW e C57BL/6), embora tendo um repertório mais diversificado que as estirpes H-2^a evidenciavam contra a MBP, tinha, também, um predomínio de sequências TCR V β 8.2 (40-48% das linhas celulares estudadas) (247, 279).

Ao mesmo tempo, no modelo animal de EAE induzida no rato Lewis estavam a surgir dados de suporte ao mesmo fenómeno de restrição do repertório TCR. BURNS *et al.* e OFFNER *et al.* descreveram, quase em simultâneo, a existência, em clones e hibridomas linfocitários, de uma diversidade limitada de genes V α e V β . Inesperadamente, uma vez mais, as sequências encontradas eram muito semelhantes às utilizadas pela estirpe B10.PL para reconhecimento da MBP1-11, sendo a combinação V α 2-V β 8 utilizada quer para o reconhecimento do epítipo major da MBP para o MHC I-A (MBP72-89), quer para o epítipo secundário, associada ao MHC I-E

(MBP87-99) (280, 281). No entanto, uma análise detalhada do repertório linfocitário utilizado para reconhecimento deste epítipo secundário levou ao reconhecimento de que nos linfócitos presentes no SNC – e, presumivelmente, responsáveis pela reacção inflamatória local – predominava a cadeia V β 6, pelo que a descrição do repertório linfocitário presente em células do sangue periférico não correspondia, necessariamente, ao encontrado no órgão-alvo (282, 283). Com base nestas e outras experiências, foi possível a HEBER-KATZ e ACHA-ORBEA propor uma “V-region disease hypothesis”, que associava o aparecimento de doenças autoimunes à expansão e activação de populações linfocitárias clonais com TCR capazes de reconhecer, especificamente, alguns antígenos presentes nos órgãos-alvo (284).

Um último tipo de experiência reforçou, mais ainda, o conceito da importância do repertório linfocitário T na geração de doenças desmielinizantes autoimunes, nomeadamente a geração de ratinhos transgénicos exprimindo repertórios limitados. Tal como KUCHROO *et al.* tinham feito para a estirpe SJL, Joan GOVERMAN e, depois, Juan LAFAILLE geraram ratinhos transgénicos para a estirpe B10.PL (H-2^u), na qual a resposta imune contra o antígeno AcMBP1-11 era bem conhecida. Os primeiros produziram ratinhos transgénicos por inserção de sequências TCR rearranjadas e clonadas em plasmídeos V α 2.3/J α 39 e V β 8.2/D β 2/J β 2.6 em oócitos C57BL/6xDBA/2 F2, com cruzamento posterior para a estirpe B10.PL (285). Na maioria destes animais, detectou-se a presença de uma população numericamente muito considerável de linfócitos V α 2+ (90%) na periferia, sem haver evidência de deleção clonal tímica desta população auto-reactiva de linfócitos. Estes ratinhos eram susceptíveis à indução de EAE com MBP e *pertussis*; mais importante, no entanto, vários destes animais desenvolviam EAE espontaneamente, entre as 5 semanas e os 5 meses de idade, sobretudo se mantidos em condições não-estéreis (285). Com base nestes resultados, foi possível tirar duas ilações principais: a presença de uma população linfocitária auto-reactiva, se numericamente significativa, é uma condição suficiente para o aparecimento de EAE, e o contacto

provável com agentes patogénicos presentes normalmente no ambiente pode despoletar, nesses casos, uma reacção autoimune – o que permitiria estabelecer um paralelo significativo com o aparecimento da Esclerose Múltipla (285). Este modelo etiopatogénico, conforme descrevemos no capítulo anterior é, hoje, quase consensualmente aceite.

O segundo avanço realizado com base nos modelos transgénicos foi alcançado por LAFAILLE, trabalhando no laboratório de Susumu TONEGAWA. Levando o conceito de restrição de repertório um passo mais longe, estes autores produziram ratinhos transgénicos possuindo um receptor TCR $\alpha\beta$ restrito ao haplotipo H-2^u, e presente em clones encefalitogénicos reactivos contra a AcMBP1-11. De seguida, cruzaram estes animais com ratinhos *knock-out* para a enzima RAG-1 (*rag1*^{-/-}) e, portanto, incapazes de produzir, por eles mesmos, um repertório TCR. Como resultado deste cruzamento, os autores puderam comparar o aparecimento de EAE em ratinhos TCR transgénicos, mas que possuíam ainda outras populações linfocitárias geradas espontaneamente (T/R+), com ratinhos nos quais todo o repertório linfocitário possuía o receptor transgénico (T/R-) (286). Enquanto que nos ratinhos T/R+ ocorreram alguns casos de EAE espontânea, tal como GOVERNMAN tinha descrito, nos T/R- todos os animais desenvolviam EAE, a maioria entre as 8 e as 16 semanas de vida, com curso progressivo e invariavelmente fatal (286). Estes dados tinham duas implicações com profundo significado para a etiopatogenia da EAE: não só confirmavam a relevância do repertório linfocitário T, sendo que a presença de clones CD4⁺ auto-reactivos era condição suficiente para o aparecimento da doença, mas, também, que existia, no repertório linfocitário normal destes animais, alguma população linfocitária capaz de suprimir, pelo menos parcialmente, a função destes clones (286). Como tal, este modelo dava suporte inequívoco à existência de células T reguladoras, que, como vimos anteriormente, é hoje considerado um dos principais mecanismos responsáveis pela dinâmica clínica da Esclerose Múltipla (287).

Outros modelos transgénicos de interesse foram desenvolvidos recentemente nos laboratórios de Vijay KUCHROO, Hartmut WEKERLE e

Andreas HOLZ: ratinhos transgénicos para o TCR específico da PLP e da MOG, e duplos transgénicos TCR e Ig para a MOG. Enquanto que, para os transgénicos TCR-PLP139-151 (derivados a partir de clones encefalitogénicos e não-encefalitogénicos) ocorriam formas fulminantes de EAE espontânea, de tal forma que foi impossível manter colónias viáveis no *background* SJL H-2^s (288), no caso dos TCR-MOG35-55 foi possível observar a ocorrência espontânea numa elevada percentagem dos animais de nevrites ópticas isoladas (47% dos animais sem evidência de EAE), bem como de nevrite óptica associada à EAE (80% dos animais imunizados com o protocolo habitual, e 50% dos imunizados apenas com *pertussis*) (289). Estes dados reforçam não só o conceito da restrição TCR nas doenças autoimunes, mas, igualmente, o facto de que a EAE-MOG reproduz um dos fenótipos clínicos mais frequentes na EM, e que existe alguma relação entre antigénio provocador e fenótipo clínico. Recentemente, foi confirmada a preponderância de respostas linfocitárias contra a MOG, por comparação com a MBP ou PLP, nas formas óptico-espinais de EM prevalentes no Japão (290). A criação de duplos transgénicos para o TCR anti-MOG e, ao mesmo tempo, para uma cadeia pesada de imunoglobulina anti-MOG, de forma a possibilitar uma cooperação T-B funcional, veio a tornar ainda mais evidentes as semelhanças deste modelo com o fenótipo de neuromielite óptica (291, 292). Em ambos os casos, partiu-se da estirpe transgénica TCR anti-MOG35-55 acima descrita (ratinhos 2D2), sendo esta cruzada com ratinhos *knock-in* para uma cadeia pesada Ig anti-MOG; nestas circunstâncias, foi potenciada a produção de IgG anti-MOG, bem com a proliferação linfocitária T anti-MOG (291, 292). Uma elevada percentagem destes ratinhos (até 50%) desenvolveram, espontaneamente, sinais clínicos e histológicos de EAE, com um padrão de localização idêntico ao da neuromielite óptica de DEVIC, apesar de existirem diferenças importantes nas características específicas das alterações patológicas (ausência de lesões medulares necrotizantes e de deposição de IgM ou de anticorpos anti-aquaporina 4) (291, 292).

No que diz respeito à Esclerose Múltipla, tal como anteriormente mencionámos, desde a década de 1960 tinha sido possível identificar reactividade linfocitária contra componentes da mielina nestes doentes (157, 158). Ao longo dos 20 anos seguintes, a aplicação das técnicas de cultura linfocitária, entretanto desenvolvidas, levou à descoberta, isolamento e caracterização de linhas celulares linfocitárias contra antígenos mais específicos, à semelhança do que acontecia nos modelos animais. SHEREMATA, KNIGHT e LISAK foram, provavelmente, os primeiros a confirmar a existência de reactividade contra a MBP em linfócitos isolados a partir do líquido cefalorraquidiano e sangue de doentes com Esclerose Múltipla, e RICHERT *et al.* fez o mesmo *in vitro* com linhas celulares T de longo termo (293-297). Proliferação contra outros antígenos de mielina, a proteína proteolípídica (PLP) e glicoproteína associada à mielina (MAG) foi detectada, igualmente, em linfócitos de sangue periférico na Esclerose Múltipla, bem como em outras doenças neurológicas (298, 299), embora inicialmente estes achados não pudessem ser confirmados por outros autores (300, 301). A caracterização dos determinantes antigénicos na proteína básica de mielina, a partir de clones linfocitários humanos, levou à identificação de múltiplos possíveis epítomos, entre os quais péptidos sintéticos provenientes de várias regiões da molécula (MBP15-31, 75-96 e 83-96) (301, 302). Neste contexto, o trabalho de Kohei OTA, no laboratório de David HAFLER, veio definir o epítipo imunodominante da proteína básica de mielina, a partir do estudo de mais de 15 000 linhas linfocitárias provenientes de 51 doentes com Esclerose Múltipla. A reactividade destas linhas foi estudada com base em péptidos sintetizados com 20 resíduos amino-ácídicos, desenhados para abarcar toda a sequência da MBP (303). Das 302 linhas com reactividade à MBP total, 140 (46.4%) proliferavam contra o péptido MBP84-102, considerado, como tal, imunodominante. Aumentos de reactividade menos significativos foram também identificados contra a MBP61-82, e MBP124-142; quer os doentes quer os controles tinham frequências elevadas de linhas celulares T reactivas contra a MBP143-168 (303). O reconhecimento destes antígenos estava restrito, para

a MBP84-102, a uma região associada ao locus DR2 do MHC, e para a MBP143-168 ao Dw11 (303). Resultados semelhantes foram obtidos, igualmente, por MARTIN e PETTE (304, 305). No entanto, reactividade contra a MBP foi detectada, também, no sangue periférico de controlos saudáveis, significando a existência normal de auto-actividade contra a mielina. Muito recentemente, o envolvimento deste antígeno na patogénese da EM foi reforçado pela demonstração, *ex vivo*, da sua presença em lesões desmielinizantes. KROGSGAARD *et al.*, utilizando um anticorpo monoclonal (MK16), que detecta o antígeno MBP85-99 conjugado com moléculas DR2 (e não qualquer destes componentes em isolamento), confirmaram, por imunohistoquímica, a apresentação deste antígeno, por macrófagos e microglia, em lesões desmielinizantes no tecido cerebral de um doente com EM (306). Esta é evidência directa da participação deste epítipo da MBP na reacção imune associada às lesões de EM, e presumivelmente causadora das mesmas. Posteriormente a estas experiências iniciais, foi possível confirmar a existência de clones linfocitários T reactivos contra antígenos de mielina em doentes com EM, mas, também, em doentes com trauma encefálico e medular (307); a lesão do parênquima encefálico, independentemente da sua origem, poderia gerar clones auto-activos como epifenómeno, o que poria em causa a especificidade dessa reacção, bem como o seu papel patogénico (revisto em (308)). Nos anos seguintes, células T reactivas contra MBP, PLP, MAG e MOG foram isoladas a partir do sangue e LCR em doentes com EM, mas, identicamente, em indivíduos saudáveis (309-318). Os epítipos implicados para cada proteína foram sendo progressivamente delineados (MBP84-102, 143-168; MOG1-22, 34-56, 64-96; PLP41-58, PLP132-158, PLP161-178, 184-199, 190-209), embora sem que fosse possível, na maioria dos casos, obter consensos sobre os epítipos imunodominantes, sobretudo para a PLP (319). Mais recentemente, foi reportado que, nos doentes com EM, a reactividade contra a MBP é relativamente menos abundante que contra a PLP ou MOG, sendo este último o antígeno mais frequentemente encontrado (314, 320).

Enquanto, inicialmente, a reactividade contra epítomos da MOG foi vista como sendo mais específica dos doentes com EM, tornou-se progressivamente aparente a enorme variabilidade de respostas linfocitárias T nos doentes e em voluntários saudáveis, e a sobreposição entre estes, não sendo possível encontrar um padrão característico da doença (320); igualmente, estudos longitudinais da reactividade anti-mielina em doentes com EM revelaram flutuações heterogêneas e dinâmicas das populações linfocitárias ao longo do tempo, com relação possível com a actividade da doença (321). A resposta contra a MBP, por exemplo, estudada ao longo de um período de 18 meses em doentes com EM, exibiu marcadas flutuações, tais que a reactividade contra um epítopo é evidente numa altura, desaparece temporariamente e volta a reaparecer mais tarde (322). Mais ainda, mesmo considerando apenas um epítopo potencial, como a MBP83-99, HEMMER *et al.* descreveram a existência de uma grande heterogeneidade no que diz respeito aos elementos de restrição, uso de TCR, especificidade fina e afinidade, produção de citocinas e expressão de marcadores de activação, em 41 clones T derivados de doentes com EM e controles (323). A diferença entre os clones presentes em doentes e saudáveis poderia residir, eventualmente, no estado de activação linfocitária, ou no fenótipo celular baseado no tipo de citocinas produzido. Assim, Jingwu ZHANG demonstrou, através de análise de diluição limitante, e estimulação com IL-2 recombinante na presença de MBP e PLP, uma frequência muito superior de células T activadas no sangue periférico de doentes com EM; no que diz respeito ao LCR, até 7% das células reactivas à IL-2 eram específicas para a MBP, um valor cerca de 10 vezes superior à frequência no sangue do mesmo doente, e inexistente nos controles saudáveis (313). Uma maior expressão do receptor para a IL-2 em linfócitos anti-MBP foi, também, encontrada nos doentes com EM, e uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias (319, 320, 324-326).

Outra prova da relevância clínica dos antígenos da MBP encontrados nos estudos supracitados veio, à semelhança do que já tinha sido feito com o ratinho, da geração de modelos transgénicos, neste caso exprimindo

sequências de TCR e MHC humanas associadas à EM. MADSEN *et al.* criaram ratinhos transgênicos que exprimiam ou o gene DRA*0101/DRB1*1501 associado à EM em populações de ascendência europeia, um TCR proveniente de um clone T específico para esse haplotipo DR2 e reactivo ao epítipo imunodominante MBP84-102, derivado de um doente com EM, ou o co-receptor humano CD4, e fizeram cruzamentos entre eles. Nos animais que exprimiam conjuntamente o DR2/TCR, ou DR2/TCR/CD4, a imunização com MBP84-102 desenvolveram EAE clínica e histológica típica (327). Foi possível observar EAE espontânea em apenas 4% destes ratinhos; no entanto, após cruzamento com ratinhos *rag2*^{-/-}, gerando, assim, animais nos quais o repertório TCR era restrito ao transgene humano, a incidência subiu para 100%, demonstrando, desta forma, que as células T específicas para aquela combinação MBP:DR2 eram condição necessária e suficiente para o aparecimento de doença (327). Um segundo modelo foi criado para estudar o epítipo MBP111-129 associado ao gene HLA DRB1*0401, relacionado a formas progressivas da doença, sobretudo em populações mediterrânicas. Para tal, foram criados ratinhos transgênicos para o TCR de um clone anti-MBP111-129 proveniente de um doente com EM, e foi feita transferência adoptiva de linfócitos CD4⁺ para ratinhos transgênicos DRB1*0401 irradiados e tratados com *pertussis*, levando ao aparecimento de EAE (328). Clínica e histologicamente, estes animais tinham um fenótipo incomum, juntando ao quadro de mielite transversa, sinais de envolvimento do tronco cerebral e nervos pares cranianos, tal como acontece nas formas progressivas da EM (328). Esta particularidade, associada aos dados acima referidos sobre o atingimento preferencial do nervo óptico e medula nos transgênicos MOG, poderá significar uma associação topográfica entre o antigénio indutor, a sede da patologia e a clínica subsequente, permitindo, assim, uma melhor compreensão da heterogeneidade clínica encontrada nos doentes com EM.

A questão da restrição de repertório linfocitário na resposta imune em doentes com Esclerose Múltipla foi igualmente estudada nesta altura; Kai WUCHERPFENNIG, no seguimento do trabalho de OTA (303), descreve a

existência de restrição V β em linhas celulares reactivas à MBP84-102 e MBP143-168 (329). Enquanto que as linhas reactivas contra o epítipo imunodominante exprimiam, predominantemente, os genes V β 17 e V β 12, para o epítipo secundário havia uma maior diversidade (329). Na mesma altura, Jorge OKSENBERG, do grupo de STEINMAN, conseguiu amplificar as sequências V α a partir de ARN mensageiro isolado das lesões cerebrais de 3 doentes com formas crónicas de EM. Embora a diversidade encontrada fosse maior que para a região V β , transcritos V α 10 foram encontrados sempre nos doentes, sugerindo que este TCR pudesse estar envolvido no reconhecimento de um epítipo importante (330). Posteriormente, KOTZIN *et al.* e OKSENBERG *et al.* reportaram uma restrição V β 5.2 e V β 6.1 do TCR de linfócitos clonados a partir do sangue periférico, ou de ARN mensageiro extraído de placas do SNC de doentes com Esclerose Múltipla, respectivamente (331, 332) e, mais recentemente, ZANG *et al.* uma predominância dos genes V α 3 e V α 8 em clones T anti-MBP83-99 DR2-restritos (333). Estudos da evolução dinâmica do repertório V β em doentes com EM confirmaram, igualmente, a presença de expansões oligoclonais de alguns genes V β , associados quer à presença de reactividade anti-MBP, como, também, à detecção de lesões inflamatórias encefálicas por ressonância magnética (334). No seu conjunto, os vários epítopos da MBP foram sendo associados a diferentes genes V β : V β 17, 12, 7 e 8 ao MBP84-102 (329, 335); V β 7 ao MBP111-129 (336); V β 14 ao MBP143-168 (329). OFFNER e VANDENBARK reviram, recentemente, os dados publicados sobre mais de 750 clones T, e referem um aumento da frequência das sequências V α 8 e V β 5 nos doentes com EM, não relacionadas com a presença ou ausência do haplotipo DR2 associado à EM (337). No entanto, outros resultados vieram lançar dúvidas sobre a existência clara destas restrições TCR, e evidenciar uma heterogeneidade muito maior da resposta imune. Não só foi encontrada uma grande variabilidade entre doentes individuais na sua resposta contra a MBP, no que diz respeito a epítopos e a uso de TCR (301, 338-341), como, também, a extracção de ARN a partir de lesões desmielinizantes em

actividade, revelou a presença de grande variabilidade de repertório, de doente para doente, mas, igualmente, de lesão para lesão (342).

No entanto, apesar destes resultados em parte contraditórios, manteve-se como hipótese provável que a resposta linfocitária contra as proteínas de mielina era mediada por algumas populações de clones T auto-reactivos restritos a determinados epítomos imunodominantes, e utilizando um repertório limitado de genes do TCR (343, 344). Hipoteticamente, esta restrição V β poderia ser sinal de uma expansão clonal mediada por superantigénios bacterianos, explicando, em parte, a associação da EM às doenças infecciosas (345). A capacidade dos superantigénios bacterianos desencadear reacções desmielinizantes e EAE em vários modelos animais necessitando, para isso, apenas da presença de clones auto-reactivos com repertório V β adequado foi demonstrada por vários autores, dando suporte a esta teoria (346-350). Por exemplo, BROCKE *et al.* demonstraram que, na estirpe PL/JxSJL F1 (H-2^u), a administração da enterotoxina B do estafilococo levava ao aparecimento de EAE em animais imunizados com AcMBP1-11, ao agravamento clínico de formas frustradas da doença, através da activação *in vitro*, ou *in vivo*, de clones linfocitários T V β 8+ de forma não antigénio-específica (346). Por outro lado, o enviesamento do repertório TCR nas doenças autoimunes poderia ser alvo de uma resposta imune auto-reguladora, quer natural quer artificial. Naturalmente, a resposta anti-TCR poderia fazer parte dos mecanismos de controlo automático da resposta imune na EAE, através de um circuito em que linfócitos CD4+ reactivos contra péptidos derivados dos TCR patogénicos, gerados espontaneamente durante a resposta imune, recrutariam outras células reguladoras para inibir a função dos clones possuidores desses mesmos TCR patogénicos, conforme proposto por KUMAR e SERCARZ (351). Por outro lado, várias estratégias terapêuticas poderiam ser desenhadas para potenciar estes mecanismos auto-reguladores, por exemplo através da vacinação com péptidos derivados dos TCR associados ao aparecimento de Esclerose Múltipla (352).

6. A heterogeneidade da resposta imune: degeneração de reconhecimento e de apresentação, mimetização molecular e diversificação de epítomos. Caracterização estrutural do complexo trimolecular. Implicações para a imunopatogénese e terapêuticas antígeno-específicas.

Tal como acima descrevemos, a partir dos modelos animais tinha sido possível identificar epítomos imunodominantes para cada estirpe, dentro dos vários antígenos presentes na mielina do SNC. Nesses modelos, habitualmente gerados em estirpes endogâmicas homogêneas para os genes HLA, tornou-se possível isolar e perpetuar clones linfocitários encefalitogénicos, e nestes foram identificadas restrições TCR características para cada antígeno – ou seja, complexos trimoleculares (MHC-antígeno-TCR) associados à doença. Estes dados permitiram desenhar formas de terapia específicas que, interferindo na formação desses complexos, impedissem a activação linfocitária e, conseqüentemente, o fenómeno neuro-inflamatório. Como também vimos, quando se passou dos modelos experimentais para doentes com EM não foi possível obter um perfil de resposta imune tão nítido, sendo evidente não só uma grande heterogeneidade de resposta intra e inter-individual mas, também, a ausência de dominância na resposta imune. No entanto, continuou a prevalecer o conceito da existência de antígenos dominantes para a resposta imune na EAE e na EM, e, portanto, de alvos preferenciais para as terapêuticas antígeno-específicas.

No entanto, a evolução dos conceitos sobre a selecção de antígenos e repertórios, sobre a especificidade do reconhecimento e apresentação antigénica, e sobre a dinâmica da resposta imune vieram pôr em causa, ou pelo menos a colocar sob uma nova perspectiva, estes pressupostos. Por um lado, as condições experimentais, utilizadas para testar a antigenicidade das sequências peptídicas, são, do ponto de vista da apresentação de antígeno, inerentemente diferentes das condições fisiológicas em que estes são apresentados. Assim, péptidos processados no citoplasma para apresentação

em moléculas de MHC assumem uma conformação (conformação tipo A) potencialmente diferente da de péptidos “carregados” exogenamente no MHC, por exemplo após clivagem proteolítica, ou em ensaios experimentais (conformação tipo B) (353). Desta forma, apenas epítomos derivados da conformação A são submetidos a selecção negativa no timo, enquanto que epítomos tipo B poderiam surgir em condições de destruição tecidual, e.g., durante respostas inflamatórias no SNC. Em segundo lugar, a maioria das sequências oligopeptídicas associados à EAE ou, depois, confirmados como antigénios na EM, exibem relações de alta afinidade para com as moléculas de MHC, o que justifica a sua aptidão para induzir reacções proliferativas. No entanto, com base nessa mesma alta afinidade, em condições fisiológicas o repertório linfocitário contra estes epítomos seria eliminado no timo por meio de selecção negativa (354, 355). Como tal, o seu papel imunodominante poderia ser, apenas, um artefacto experimental e, na realidade, outros antigénios de menor afinidade desempenhar um papel mais relevante. Com base neste raciocínio, foi proposta a hipótese por RIDGWAY, FASSO e FATHMAN de que as associações HLA-autoimunidade fossem baseadas não numa maior afinidade para com os antigénios-alvo, mas precisamente porque essas moléculas de MHC permitem a fuga dos clones auto-reactivos T devido à sua fraca capacidade de apresentação dos mesmos (356), ou seja, que à quimiodominância (ligação ao MHC) não corresponde a imunodominância (autoimunidade) (357). Neste modelo, antigénios de menor afinidade com o MHC poderiam desencadear reacções imunes suficientemente fortes (explicando, assim, o paradoxo evidente de antigénios de menor afinidade serem os causadores da autoimunidade) desde que a avidez da ligação célula T à célula apresentadora fosse mais elevada. Uma vez que a avidez é o resultado não só da afinidade péptido-MHC, mas, também, de todas as outras interacções entre moléculas co-receptoras, co-estimuladoras, moléculas de adesão, e mecanismos de sinalização intracelular, um péptido de baixa afinidade poderia gerar respostas imunes potentes em contextos nos quais a apresentação fosse feita de forma apropriada, por exemplo, em processos inflamatórios. Exemplificando este

conceito, Bibiana BIELEKOVA, do grupo de Roland MARTIN, comparou os padrões de reactividade a 15 péptidos anteriormente identificados como imunodominantes, entre doentes com EM e controles saudáveis, utilizando concentrações 10 a 100 vezes menores de antígeno – ou seja, seleccionando clones de alta avidéz. Os seus resultados confirmaram que não só os doentes com EM tinham frequências até 4 vezes superiores de células T CD4+ anti-mielina, e estas apresentavam fenótipos predominantemente pro-inflamatórios (Th1) como, também, os principais epítomos imunodominantes e discriminatórios entre as duas populações não incluíam a MBP83-99 (identificada em vários estudos) mas, sim, a MBP13-32, MBP111-129, MBP154-170, PLP139-154, MOG1-20 e MOG35-55. Qualquer destes epítomos, quando estudado do ponto de vista da sua afinidade potencial para os MHC expressos, revelou ser de baixa afinidade, confirmando assim a hipótese de RIDGWAY (358).

A necessidade de formas mais abrangentes, e não enviesadas por hipóteses *a priori* acerca dos antígenos potencialmente mais relevantes, levou, recentemente, ao desenvolvimento de várias tecnologias para avaliação simultânea da proliferação contra painéis de péptidos contendo múltiplos alvos potenciais, e para a descoberta de alvos antigénicos para a resposta imune celular e humoral. Entre estes encontram-se, para dar apenas alguns exemplos, a avaliação de bibliotecas de expressão de cADN, bibliotecas de expressão em fagos (*phage display libraries*), ensaios ELISPOT, dímeros e tetrâmeros de MHC, e bibliotecas de péptidos combinatórios (*combinatorial peptide libraries*) (359-364). No que respeita à resposta T têm sido, sobretudo estas três últimas, as técnicas mais usadas para a descoberta de alvos antigénicos na EM. Enquanto que os ensaios ELISPOT, ou os tetrâmeros de MHC carregados de péptido, têm a vantagem da detecção de clones de baixa frequência para um determinado alvo antigénico, e, no caso do ELISPOT, permitem determinar o fenótipo das células com base na secreção de citocinas, estão necessariamente limitados pela escolha de péptidos a serem testados e dependem, como tal, do

conhecimento prévio dos antígenos prováveis – ou seja, não descobrem, na realidade, novos antígenos, mas confirmam a sua relevância.

Outro tipo de abordagem é possível com as bibliotecas de péptidos combinatórios sintéticos (*synthetic combinatorial libraries* ou SCL). Neste caso, não se parte do conhecimento do antígeno, mas procuram-se os ligandos peptídicos possíveis para um determinado clone linfocitário derivado de um órgão-alvo, ou fluido biológico, partindo apenas da sua capacidade proliferativa *in vitro* contra uma biblioteca de péptidos de tamanho determinado, gerada aleatoriamente. Para um determinado oligopéptido alvo com n resíduos, são sintetizados péptidos em que uma das posições ($p_1...p_n$) é ocupada por um aminoácido definido e nas restantes, são feitas misturas em que qualquer amino-ácido pode ocupar uma das outras posições de forma aleatória (*positional scanning concept*). Assim, para se testar, por exemplo, a proliferação de um clone T contra um tripéptido composto de 4 aminoácidos possíveis, se for empregue o processo clássico de síntese de péptidos com todas as combinações possíveis, seriam necessários 64 (4^3) péptidos sintéticos. Utilizando as SCL, seriam necessárias apenas 12 misturas aleatórias: OXX, OXO e XXO, em que O representa um dos quatro aminoácidos possíveis, e X uma mistura aleatória dos mesmos quatro. Teríamos, assim, O_1XX , O_2XX , O_3XX e O_4XX para a primeira posição, e de forma idêntica para a segunda e terceira, num total de apenas 12 misturas. Se para alvos deste tamanho os números não são muito divergentes (64 versus 12), para alvos maiores as vantagens das SCL são imediatamente aparentes: para testar um hexapéptido com todos os 20 aminoácidos possíveis, seriam necessários 6.4×10^7 (20^6) péptidos sintéticos, contra apenas 120 misturas (20AA x 6 posições) (364). Os resultados da proliferação contra as misturas SCL tem de ser posteriormente analisados para obter a sequência, ou sequências, peptídicas capazes de estimular o clone testado, e estas sequências têm, por sua vez, de ser identificadas (por comparação com bases de dados de proteínas), sintetizadas artificialmente e testadas *in vitro* e *in vivo* para confirmar a sua actividade biológica (364). A análise pode ser feita quer pela identificação simples dos resíduos amino-acídicos mais

activos para cada posição, ou através de análises matriciais combinatórias, conforme descrito por SOSPEDRA, PINILLA e MARTIN (364).

Aplicando esta técnica, HEMMER *et al.* foram capazes de identificar, utilizando uma SCL para X11 undecapéptidos (20^{11} combinações possíveis, ou 2.05×10^{14} péptidos potenciais), para um único clone CD4+ anti-MBP86-96 DR2b-restrito, vários ligandos possíveis derivados de antígenos do próprio e não-próprio, incluindo antígenos bacterianos (365). Curiosamente, a MBP86-96, utilizada para seleccionar o clone a partir do sangue de um doente com EM, não era, sequer, o ligando mais potente; várias modificações da sequência antigénica eram possíveis, e algumas produziam agonistas mais potentes sem modificar a força de ligação ao MHC (365). Como tal, não só este tipo de experiência possibilita a descoberta de alvos antigénicos até então insuspeitos em doenças autoimunes ou imuno-mediadas como a EM (através da detecção de clones reactivos contra esses antígenos), mas, também, dá suporte ao conceito de reconhecimento antigénico degenerado, ou degenerescência do TCR, que se encontra na base da teoria da mimetização molecular, em que a autoimunidade é causada pela reactividade cruzada entre antígenos do próprio, e antígenos microbianos molecularmente semelhantes (366-370). Como discutiremos no próximo capítulo, este reconhecimento degenerado é fundamental para compreender o mecanismo de acção dos ligandos peptídeos alterados (371). A mimetização molecular, termo usado inicialmente para explicar infecções virais persistentes, nas quais o vírus codificaria antígenos semelhantes ao MHC permitindo-lhe, assim, escapar ao sistema imune, evoluiu, posteriormente, para o conceito de semelhança molecular entre antígenos microbianos e do próprio, causadora de uma reactividade cruzada aberrante e geradora de doença autoimune (372, 373). Embora conceptualmente muito atractiva, esta teoria esbarrava na especificidade da resposta linfocitária, e só recentemente começaram a surgir casos mais concretos de correlação entre infecções e doenças neurológicas, tais a doença de Lyme ou a parafrazeia espástica tropical (374, 375). No que diz respeito à especificidade do reconhecimento antigénico, a existência de degenerescência, ou plasticidade

de reconhecimento, providenciou um mecanismo explicativo para a reactividade cruzada. Inicialmente pensou-se que a mimetização molecular dependia de uma homologia completa de sequência, e FUJINAMI e OLDSTONE foram os primeiros a encontrar uma homologia antigénica entre a MBP66-75 e a polimerase do vírus da hepatite B, e induziram respostas linfocitárias T e B, bem como evidência histológica de EAE em coelhos após imunização com o péptido viral HBV-P589-598 (376). Posteriormente, os requisitos de mimetização evoluíram da homologia completa para a homologia de resíduos de contacto com o MHC ou TCR (377), reconhecimento na ausência de qualquer resíduo em comum (378) e, finalmente, reconhecimento com base na homologia estrutural (379); embora o conceito continue a gerar bastante interesse, continua a haver pouca evidência da sua importância na EM (revisto em (261)).

A capacidade de um TCR reconhecer vários antígenos diferentes (reactividade cruzada, plasticidade ou degenerescência) parece ser uma propriedade geral deste tipo de receptor antigénico, e baseada no tipo de interacção com o complexo MHC-péptido, na qual são combinadas as características moleculares dos resíduos amino-ácidos do antígeno expostos ao reconhecimento com os das cadeias α e β do MHC que interagem com o TCR (368). O principal determinante da capacidade de reconhecimento degenerado de um TCR é, provavelmente, a sua estrutura tridimensional, resultante da sequência das suas regiões CDR3 que formam a bolsa central de reconhecimento antigénico (368). Actualmente, segundo KROGSGAARD e DAVIS, o conceito de interacção antígeno-TCR evoluiu do modelo “chave-na-fechadura” clássico, baseado em duas superfícies relativamente rígidas, para um modelo “encaixe-induzido” em que existe alguma flexibilidade da parte do TCR para se adaptar à superfície MHC-antígeno apresentada (380). Neste modelo, o reconhecimento processa-se em duas fases, uma inicial de contacto do TCR com a hélice α do MHC, seguida de uma moldagem à fenda antigénica criando as ligações de alta energia necessárias à activação linfocitária; os principais determinantes desta activação seriam a força de ligação, determinada pela semi-vida do

ligando, combinada com uma mudança da capacitância calorífica (ΔC_p) do TCR, correspondente provavelmente a uma alteração conformacional tipo torção que altera a sua relação com as moléculas sinalizadoras vizinhas, determinando a sua activação (380).

A interacção entre antigénio e TCR tem sido considerada, tradicionalmente, como sendo muito específica, e a detecção de resíduos amino-ácídicos chave para o reconhecimento – posições de contacto – uma evidência de que o número de antigénios reconhecíveis por um linfócito T seria, necessariamente, reduzido (381). No que diz respeito à sequência MBP85-99, três resíduos contacto fundamentais para a interacção com o TCR – His90, Phe91 e Lys93 - foram identificados (382, 383). No entanto, tornou-se aparente que o reconhecimento continuava a ser possível, mesmo em antigénios muito diferentes, desde que esses resíduos se mantivessem semelhantes; por exemplo, WUCHERPFENNIG e STROMINGER demonstraram que clones T anti-MBP85-99 de doentes com EM reconheciam péptidos dos vírus Epstein-Barr, Herpes simplex, Adenovirus 12, Influenza A e da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (377). Todos os antigénios microbianos reconhecidos possuem a mesma dupla de resíduos His-Phe, com uma preferência para um resíduo de carga positiva na terceira posição (Lys ou Arg), sendo a restante sequência muito menos importante (368). Com base neste tipo de dados, KERSH e ALLEN propuseram que qualquer péptido poderia ser reconhecido desde que possuísse um motivo de ligação ao MHC e, pelo menos, um contacto chave para o TCR (366), o que foi mais tarde modificado para um modelo em que nenhum resíduo era estritamente necessário desde que a combinação das forças de ligação de toda a sequência providenciasse energia suficiente para a ligação ao MHC e ao TCR (378); o tamanho do péptido poderia ser igualmente variável, até um mínimo de 4 resíduos, desde que ajustados optimamente ao MHC e TCR (384). No seu conjunto, estes dados parecem apontar para uma base estrutural para a degenerescência de reconhecimento: desde que a topologia tridimensional, “vista” pelo TCR, do conjunto MHC-antigénio seja semelhante, pode haver reactividade cruzada e, consequentemente,

mimetização molecular. Recentemente, a cristalização de dois alelos MHC associados à EM, DRB1*1501 e DRB5*0101, carregados, respectivamente com MBP85-99 ou um péptido derivado do vírus Epstein-Barr, revelou um elevado grau de semelhança estrutural, associada à capacidade de estimulação do mesmo clone T derivado de um doente com EM (379).

Em relação à ligação TCR-MHC na EM, a caracterização da interacção do TCR anti-MBP85-99 com a molécula de MHC classe II DRB1*1501 revelou um contacto fundamental entre um resíduo polimórfico na cadeia β do MHC (DR β 67) e a cadeia β diversa do TCR, e entre as cadeia α não polimórfica do MHC e a cadeia α conservada do TCR (385). O estudo pormenorizado da interacção entre estas duas moléculas revelou, também, algumas particularidades na EAE e EM. Enquanto que, tipicamente, a orientação de acoplagem entre o TCR e o MHC segue uma linha diagonal entre 45°-70°, estudos realizados num clone anti-MBP85-99 (Ob.1A12) de um doente com EM, mostrou um alinhamento aberrante de 110° (386); neste, e noutro clone (3A6) anti-MBP89-101, o reconhecimento estava desviado para o N-terminus, envolvendo resíduos de contacto (VxFHxK para Ob.1A12 e FxKNxV para 3A6) e restrições MHC diferentes (387). Em ambos os casos, bem como para a interacção MHC-TCR no modelo de EAE em ratinhos transgénicos TCR Vb8.2/AcMBP1-11/H-2u, as características estruturais apoiam o conceito de uma interacção aberrante, de baixa afinidade, com reconhecimento antigénico sub-óptimo, nestes clones auto-reactivos (388). No que diz respeito à hipótese da mimetização molecular, tal conceito faria completo sentido: em circunstâncias normais, clones potencialmente auto-reactivos seriam gerados no timo, e não sofreriam selecção negativa, dada a sua elevada especificidade para ligandos microbianos potenciais e baixa afinidade para ligandos autólogos. A sua interacção com estes últimos seria possível apenas no contexto de uma série de alterações estruturais e funcionais, como sejam o reconhecimento sub-óptimo, afinidade reduzida, e topologia aberrante (388).

No que diz respeito à apresentação de antigénio, a identificação da especificidade para determinados epítomos das moléculas de mielina,

dependente de espécie, e de estirpe, implicava que a resposta imune contra estas proteínas estava dependente de genes de resposta imune relacionados com o reconhecimento de antígeno, como, por exemplo, os genes do sistema HLA–MHC. Do ponto de vista imunológico, a heterogeneidade da resposta linfocitária contra os componentes antigénicos da mielina, encontrada nos doentes com EM, tornar-se-ia menos estranha, dado tratar-se de uma população heterogénea e exogâmica, e na qual, portanto, existe uma grande diversidade potencial nos genes de resposta imune e HLA. Apesar disso, a prevalência de determinados haplotipos HLA nesta população poderia explicar o carácter mais imunodominante de determinados antígenos, como seja a MBP84-102 associada ao DR2 (303).

As bases estruturais para a apresentação de antígenos, no contexto de moléculas de MHC classe II, foram sendo exploradas progressivamente, sobretudo no que diz respeito ao haplotipo DR2, composto das duas cadeias β DRB1*1501 e DRB5*0101, associado à apresentação do antígeno MBP84-102. Estas duas cadeias β são expressas no haplotipo DR2, conjuntamente com a mesma cadeia α DRA*0101, formando dois heterodímeros funcionais: DR2a (DRA*0101, DRB5*0101) e DR2b (DRA*0101, DRB1*1501) (389). As interacções estruturais entre o péptido MBP85-99 e as cadeias β que compõem o haplotipo DR2 foram extensivamente descritas por WUCHERPFENNIG *et al.* (383). Estes autores, utilizando sequências N e C-terminais truncadas, e análogos com substituições de alanina para cada posição, definiram para os resíduos âncora fundamentais para cada alelo: Val89 e Phe92 para o DRB1*1051, e Phe92 e Lys93 para o DRB5*0101 (383). Os resíduos-contato para o TCR, a que nos referimos anteriormente, foram definidos, igualmente, neste trabalho. As “leituras” do mesmo antígeno por cada molécula DR resultavam em resíduos-âncora e de contacto expostos para interacção com o TCR diferentes nestes dois alelos. Estas diferenças eram relacionáveis com os polimorfismos da cadeia β do MHC: o dimorfismo Gly/Val na posição DR β 86, conjugado com os resíduos DR α 26 (Phe) e DR α 31 (Ile) na cadeia α oposta, controlavam o tamanho de uma bolsa hidrofóbica presente nessa região da molécula. Enquanto que no

DRB5*0101 temos DRβ86Gly, permitindo um resíduo aromático na bolsa (Phe92), no DRB1*1501 temos DRβ86Val, o que obriga a um resíduo alifático menor (Val89) (383). Posteriormente, a expressão e cristalização do heterodímero DR2b (DRA*0101, DRB1*1501) com a MBP85-99 permitiu uma melhor compreensão das complexidades estruturais da apresentação deste antigénio com base na cristalografia de raios-X com resolução de 2.6 angstrom (382, 390). Confirmou-se, deste modo, que os resíduos contacto para o TCR deste péptido da MBP, anteriormente identificados, se encontravam expostos, de forma proeminente, ao exterior: His90 na posição P2, Phe91 na posição P3 e Lys93 na posição P5 (382). As interações do péptido MBP na fenda de apresentação do MHC eram entre os resíduos Val89, Phe92, Asn94 e Thr97 e as bolsas P1, P4, P6 e P9 respectivamente. Destes, particularmente importante era o encaixe da fenilalanina na bolsa P4; a cadeia lateral aromática deste amino-ácido é permitida pela existência de uma bolsa hidrofóbica formada pelos resíduos DRβ78 (Tyr), β13 (Arg), β26 (Phe), β28 (Asp), β70 (Gln) e β71 (Ala). Destes, o polimorfismo existente nesta última posição – DRβ71 – é particularmente importante, porque a presença de uma alanina no DR2 cria o espaço necessário para a cadeia lateral da fenilalanina da MBP (382). O mesmo tipo de estudo cristalográfico, realizado para o heterodímero DR2a (DRA*0101, DRB5*0101) conjugado com a MBP86-105, com uma resolução de 1.9 angstrom, demonstrou diferenças fundamentais nos resíduos-âncora e resíduos-contato, com uma leitura do péptido (*reading frame*) desviada em três resíduos, atribuível à formação de uma grande bolsa P1, que dessa forma encaixa a cadeia lateral aromática da Phe92, em combinação com uma bolsa P4 pouco profunda, ocupada pela Ile95 (391). Estes pormenores topológicos, definidores das relações estruturais entre péptidos e MHC, seriam importantes não só para a compreensão da capacidade de apresentação e definição dos epítomos para cada antigénio, mas, também, para o desenho de ligandos peptídeos com características de agonista parcial, superagonista, ou antagonista – ligandos peptídeos alterados (*altered peptide ligands*, APL), com capacidade de influir no desenrolar da

resposta imune, e, consequentemente, no curso das doenças imuno-mediadas como a EM.

Como anteriormente referimos, ZAMVIL *et al.* foram dos primeiros a correlacionar a resposta contra um antigénio de mielina (nesse caso a sequência AcMBP1-11) com um tipo particular de MHC classe II presente numa estirpe de ratinho (PL/J, I-A^u) (216, 217). No entanto, ao longo dos anos, várias características pouco usuais foram sendo descobertas neste sistema: a necessidade de acetilação amino-terminal para garantir a encefalitogenicidade (216), uma ligação muito fraca entre o antigénio e o MHC (392, 393), a capacidade de resposta a péptidos truncados, com uma sequência mínima AcMBP1-6 suficiente para a estimulação linfocitária (394) e a possibilidade de competição com esta sequência por parte de epítomos crípticos da MBP (395). A caracterização estrutural detalhada da apresentação da AcMBP1-11 pelo MHC I-A^u permitiu compreender algumas destas particularidades, e explicar os resultados obtidos com os ligandos peptídeos alterados deste antigénio (396). A molécula I-A^u alberga, apenas, na sua fenda de apresentação, os sete primeiros resíduos do péptido MBP, cuja *reading frame* se encontra deslocada de tal forma que o término carboxi fica de fora do MHC. O resíduo acetil N-terminal neutraliza a carga do primeiro resíduo, e permite-lhe ficar engolfado na fenda de apresentação; a bolsa P6, cuja interação com o quarto resíduo da MBP é fundamental para a estabilidade da interação, sendo muito profunda é composta de um pescoço hidrofóbico e uma base hidrofílica, e favorece a acomodação de um amino-ácido volumoso (396). Na sequência MBP nativa, o quarto resíduo é uma lisina, que não ocupa toda a bolsa P4, explicando a pouca afinidade e capacidade estimuladora deste péptido; como veremos adiante, a substituição deste resíduo por uma tirosina resulta num APL superagonista, porque a cadeia lateral da tirosina ocupa totalmente a bolsa P4, resultando numa maior estimulação linfocitária. Estas substituições de amino-ácidos na posição 4 da MBP aumentam a afinidade de ligação à medida que o carácter hidrofóbico do resíduo aumenta (Ala<Val<Met<Tyr), dada a natureza hidrofílica da bolsa P4 (396). Na última posição, P9, encontra-se uma ligação

de hidrogénio entre o MBP7Ser e o resíduo 69 da cadeia β (Asn β 69), que estabiliza a posição do péptido na fenda. A extensão da sequência deste péptido no seu término carboxi, até à posição 22, revelou a presença de um epítipo críptico com muito maior afinidade, em que as posições âncora MBP2, 4 e 9 são substituídas pelas MBP12-Ser, MBP14-Tyr e MBP17-Thr. Em especial, a substituição da MBP4-Lys pela MBP14-Tyr, como vimos acima, resulta numa muito maior afinidade de ligação na bolsa P4 (396).

Desta forma, não só a presença deste epítipo críptico pode ser vista como uma forma de subversão imune, tal como proposta por SERCARZ (397), em que o processamento natural da MBP levaria à apresentação deste resíduo de maior afinidade, como as mudanças de leitura dos péptidos (*reading frame shifts*, ou *register shifts*) conferem uma dimensão adicional ao conceito de reactividade cruzada do TCR (396). Por último, a posição carboxi-desviada da AcMBP1-11 na fenda de apresentação contribui para explicar a restrição TCR V β 8.2 anteriormente discutida, uma vez que, em virtude da sua localização na fenda e do alinhamento diagonal das cadeias α e β do MHC e TCR, a maioria dos resíduos-contato da MBP com o TCR estão relacionados com a cadeia β desta molécula, nomeadamente com o seu resíduo V β 8 Tyr50 β (396).

Resulta evidente, de descrições estruturais como a acima, bem como de estudos de afinidade de ligação péptido-MHC, que a especificidade de um MHC para um determinado antígeno não é completa, e existe um grau considerável de degenerescência de apresentação: uma única molécula de MHC pode apresentar centenas de péptidos diferentes, desde que possuam, em comum, cerca de 5 resíduos-âncora, não necessariamente sempre iguais, e que no seu conjunto garantam uma interacção forte entre o antígeno e o MHC (398-401). Tal como o TCR, o MHC não tem tanto especificidade de sequência, como de estrutura molecular. Para o alelo DRB1*1501, das 5 âncoras as posições P6, P7 e P9 são altamente degeneradas, enquanto que a P1 e P4, sendo mais específicas, permitem várias substituições por amino-ácidos estruturalmente semelhantes (383). VALLI *et al.*, estudando a capacidade de ligação de vários péptidos derivados da MBP humana a 10

moléculas HLA-DR purificadas, confirmaram que os três principais epítomos, MBP13-32, MBP84-103 e MBP144-163 eram capazes de se ligar, pelo menos, a 3 ou mais moléculas DR, e que o MBP84-103 tinha capacidade de ligação a 9 dos 10 MHC testados (402). Mais recentemente, foi igualmente descoberto que clones linfocitários T derivados do LCR de doentes com EM têm a capacidade de reconhecer vários péptidos diferentes no contexto de diversas moléculas de HLA-DR e DQ associadas à EM (restrição promíscua) mas, também, que conseguem reconhecer o mesmo antigénio no contexto de várias moléculas DR e DQ diferentes (403). Ou seja, não só existe plasticidade de apresentação, mas esta, combinada com a de reconhecimento, possibilita múltiplos complexos trimoleculares MHC-Ag-TCR, nos quais a única constante é o antigénio.

Em virtude destes dados, o ideal da existência de um complexo trimolecular específico da doença, inicialmente proveniente dos modelos animais, foi sendo destruído progressivamente, pela confrontação com a complexidade real da resposta imune, em que o reconhecimento e apresentação antigénicas são menos específicas do que o esperado. No que diz respeito ao antigénio, no entanto, apesar da heterogeneidade encontrada entre doentes, e da ausência aparente de um epítomo imunodominante universal, poderiam ser idealizadas formas de identificação personalizada dos alvos antigénicos que permitissem terapêuticas específicas. Como anteriormente referimos, apesar de, inicialmente, terem sido propostos epítomos imunodominantes, tais como a MBP84-102 (303), particularmente no contexto de determinados alelos HLA, não foi possível confirmar a sua importância em todas as populações de doentes, nem a sua estabilidade ao longo do tempo. Por último, a descoberta do fenómeno da diversificação de epítomos, com a implicação de que os alvos antigénicos não eram estáveis ao longo do tempo, veio complicar mais ainda a possibilidade de desenvolvimento de terapêuticas antigénio-específicas nas doenças autoimunes.

A partir do final da década de 1980, constatou-se que as respostas linfocitárias T e B, contra os antigénios da mielina na EAE, não eram

estáveis ao longo do tempo e que, com o evoluir da doença, surgiam novas reactividades e, mesmo, novas restrições HLA. Este fenómeno foi inicialmente descrito por PERRY e BARZAGA para a EAE com surtos induzida activamente com MBP na estirpe de ratinhos (SJLxPL)F1 (404), e, depois, por MCCARRON, após transferência adoptiva de linhas celulares anti-MBP1-37 (405). Em ambas as situações, observou-se a modificação da reactividade linfocitária, com o aparecimento de resposta contra outros epítomos, dentro da mesma proteína, que não os encontrados inicialmente ou empregues para a indução de doença, e com a modificação da restrição HLA, passando do habitual I-A para I-E (404), ou de I-A^u para I-A^s (405). Posteriormente, foi possível, também, observar o aparecimento de reactividade contra outra proteína de mielina, neste caso a PLP, após indução de EAE em ratinhos SJL com MBP (406). Destes dados iniciais era possível concluir que a resposta T não era tão restrita como se tinha pensado inicialmente, e levava à inferência de que, para uma doença como a EAE ou a EM, que evoluía por surtos, o aparecimento de novas reactividades poderia estar relacionada com a progressão da doença. Não existia, no entanto, uma verdadeira demonstração, incontroversa, de que a modificação do padrão de reactividade era um fenómeno frequente, quais as regras a que estava sujeito, e, sobretudo, qual a sua importância patogénica. Paul LEHMANN e Eli SERCARZ foram os primeiros a demonstrar a existência de uma cascata de diversificação da resposta T contra vários antigénios da MBP, empregando a estirpe cruzada (SJLxB10.PL) F1, com a dupla restrição HLA I-A^s e I-A^u (407). Estes autores identificaram vários determinantes crípticos na MBP, i.e., epítomos contra os quais, apesar da sua conhecida imunogenicidade e encefalitogenicidade em ambas as estirpes, não era possível encontrar reactividade após a imunização com MBP. Neste caso, após imunização com esta proteína, era inicialmente detectável reactividade apenas contra o epítomo imunodominante I-A^u AcMBP1-11. No entanto, 40 dias após a imunização, já era possível detectar reactividade contra os epítomos MBP35-47 (I-A^u), 121-140 (I-A^u) e 81-100 (I-A^s) ou seja, a dominância destes antigénios só surgia nas fases crónicas da doença. Este

mesmo fenómeno, apelidado de “diversificação de determinantes”, era observável mesmo quando se empregava para a imunização inicial apenas a AcMBP1-11 e não a proteína total (407). Ou seja, o repertório autoimune sofre um processo de evolução gradual, com a substituição da restrição inicial por uma progressiva diversificação e alargamento; neste contexto, dependendo da fase em que se estude o repertório, podem observar-se diferentes tipos de padrão de reactividade. Após a resposta inicial contra o epítipo imunodominante, os determinantes crípticos poderiam gerar reactividade por vários mecanismos, e.g., apresentação por células apresentadoras de antigénio de diferente linhagem ou sua activação, resposta ao *stress* celular e origem intra ou extracelular do antigénio (408).

A importância patogénica da diversificação de epítipos foi sendo afirmada, progressivamente, por vários autores. No modelo de EAE crónica em ratinhos SJL, MCRAE *et al.* confirmaram que a resposta imune era dominada pelo epítipo PLP139-151, quer quando a doença era induzida com PLP total, ou PLP178-191, quer quando a era pela transferência adoptiva de linhas celulares anti-MBP84-104 (409). Apesar desta dominância, no entanto, após o surto inicial e antes do segundo surto, era detectável o aparecimento de uma população anti-PLP178-191 cujo papel patogénico foi confirmado por experiências de transferência adoptiva, e pela supressão da doença após tolerização com PLP e péptidos específicos (409, 410). Estes resultados davam suporte à noção da diversificação intramolecular (dentro da mesma proteína de mielina) e intermolecular (entre determinantes de proteínas diferentes), mas, também, à correlação deste fenómeno com o aparecimento de surtos e danos no SNC; dentro do mesmo grupo, Stephen MILLER e Carol VANDERLUGT confirmaram este fenómeno e estabeleceram a sua dependência da co-estimulação apropriada através do sistema B7-1(CD80)/CD86 (411) e posteriormente foi identificada uma hierarquia de diversificação para esta estirpe, baseada na imunodominância dos epítipos, relacionada com a frequência de precursores T em circulação: PLP139-151>PLP178-191>MBP84-104 (410). Os mesmos autores foram igualmente capazes de demonstrar a existência de uma

cascata bem definida de diversificação de epítomos no modelo de desmielinização induzida por infecção crónica com o vírus de THEILER (TMEV-IDD), outro modelo de Esclerose Múltipla que evolui de forma progressiva sem surtos (412, 413). Anteriormente a estes trabalhos, e utilizando o modelo de EAE crónica na estirpe cruzada SWXJ (SWR/JxSjL/J), estudando a evolução da reactividade linfocitária ao longo do tempo, YU *et al.* já tinham estabelecido um padrão de diversificação constante e predizível para este modelo. Após a imunização com PLP139-151, assistiu-se a uma diversificação progressiva, inicialmente para o epítomo PLP249-273 (intramolecular) e, de seguida, para os epítomos PLP173-198 e MBP87-99 (intermolecular) (414). Mais ainda, confirmou-se a relação entre o aparecimento da diversificação e a ocorrência de surtos/progressão da EAE; a tolerização contra o epítomo secundário MBP87-99 resultou na supressão de novos surtos, de acordo com o papel patogénico que este epítomo teria na evolução da doença (414). Por último, TUOHY *et al.* detectaram, no mesmo modelo, concomitantemente com o aparecimento desta cascata de diversificação, o desaparecimento gradual da reactividade contra o epítomo imunodominante inicial; assim, na opinião destes autores, o conceito de imunodominância durante a autoimunidade tem de ser entendido numa perspectiva temporal de “epitope du jour”, ou de “alvo em movimento” (415-417), em que o papel de principal antigénio vai variando com a evolução destas doenças. Segundo STEINMAN, esta situação é a inversa do “pecado antigénico original”, normalmente associado ao estabelecimento de memória imune contra infecções virais, e que pondo problemas à vacinação contra variantes virais, abre hipóteses interessantes para o tratamento da autoimunidade (418). Nesta perspectiva, mesmo não se conhecendo o antigénio inicial causador da doença, poder-se-ia intervir no processo autoimune patológico bastando para isso suprimir a resposta contra um epítomo imunodominante crítico que faça parte da cascata de diversificação (418).

No seu conjunto, estes resultados significavam que durante uma doença autoimune como a EAE, e, potencialmente, a EM, a reacção imune

sofria uma evolução previsível, e aparentemente controlada e sujeita a regras bem definidas, consistindo no desaparecimento da reactividade contra o antigénio despoletante, e no aparecimento subsequente de reactividades contra outros epítomos constituintes da mesma molécula, ou de outras moléculas provenientes do mesmo órgão-alvo. O modelo adoptado em virtude disso, e defendido actualmente, é o de que, durante o ataque autoimune contra a mielina, focado inicialmente num antigénio original, são libertados detritos de mielina contendo outros antigénios potenciais, que processados por células apresentadoras de antigénio profissionais, presentes no SNC ou nos órgãos linfóides periféricos, estimulam a proliferação de populações linfocitárias específicas contra esses antigénios secundários, perpetuando assim o ciclo de destruição autoimune da mielina (419).

A demonstração da presença deste fenómeno em vários modelos animais e do papel patogénico das linhas celulares contra epítomos secundários, bem como da possibilidade de supressão da evolução da doença por terapêuticas desenhadas para tolerizar contra esses mesmos epítomos eram argumentos fortes a favor da importância da diversificação de determinantes. Em oposição a este conceito, no entanto, outros problemas foram apontados. Primeiramente, a constatação de que, sendo uma parte significativa do repertório linfocitário normal auto-reactivo, com nomeadamente, a presença de precursores linfocitários T contra antigénios de mielina nem sempre poderia ser considerada evidência de diversificação de determinantes. Nomeadamente, no ratinho SJL existe uma frequência extremamente elevada de precursores anti-PLP139-151 (1/20000 células CD4+), em virtude da expressão no timo apenas da isoforma DM20 da PLP, que não contendo este epítomo (faltando-lhe os resíduos 116-150), não leva à selecção negativa destes clones durante o estabelecimento da tolerância central no timo (420).

Em segundo lugar, a diversificação de epítomos poderia ser um fenómeno causado, exclusivamente, na periferia, sem contacto com os detritos de mielina no SNC (421). Por exemplo, o gene da MBP encontra-se incluído numa unidade de transcrição maior denominada golli-MBP, e que

codifica não só a MBP clássica como, também, as isoformas golli-MBP (422, 423); durante o curso da EAE crónica, foi detectado um aumento de expressão destas isoformas nos gânglios periféricos, levando à estimulação de clones linfocitários (424). Desta forma, seria possível ocorrer diversificação por estimulação fora do SNC, o que não teria as mesmas implicações patogénicas anteriormente propostas. Só muito recentemente foi confirmado que a activação de células contra um epítopo secundário, durante a diversificação da resposta, ocorria dentro do SNC e mediada por células dendríticas presentes localmente, i.e., que a diversificação ocorria no SNC e não à periferia. Neste caso, foi possível mostrar que, na EAE crónica induzida com PLP178-191, e na TMEV-IDD, a activação de precursores *naive* anti-PLP139-151 ocorria dentro do parênquima encefálico (425). Por último, a diversificação de epítopos poderia ser, para além de um epifenómeno sem importância (no caso da existência normal de precursores auto-reactivos), ou de um mecanismo patogénico, uma forma de regulação da resposta imune. Neste caso, a reacção contra os determinantes secundários geraria uma resposta reguladora, por exemplo pela diferenciação dos clones T em fenótipos Th2, produtores de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4/IL-10, ou TGF β , tal como tem sido proposto para outros modelos de autoimunidade como a diabetes melitus em ratinhos NOD, ou na artrite adjuvante em ratos Lewis (419, 426). Por exemplo, para a região MBP121-150 no ratinho B10.PL, dependendo da escolha de epítopo, podem gerar-se respostas Th1 ou Th2; utilizando o epítopo Th2 (MBP131-150), é possível induzir protecção contra a EAE induzida com AcMBP1-9, enquanto com o epítopo Th1 (MBP121-140) tal não é possível (421).

Apesar do apelo intelectual que o conceito da diversificação de determinantes possui naturalmente, uma vez que permite explicar o carácter evolutivo, e recidivante-remitente da EAE e EM, e dos dados que discutimos acima em seu apoio, a sua aceitação não é consensual. Por exemplo, autores como TAKÁCS e ALTMANN não foram capazes de identificar a existência de qualquer forma de diversificação no modelo de EAE em ratinhos SJL, quer no SNC, quer na periferia (427, 428), e KUMAR

descreveu a presença de diversificação mesmo na ausência de patologia no SNC, sugerindo que este poderia ser apenas um epifenómeno sem importância (421). Por outro lado, em alguns casos, o modo de indução da doença tinha, também, impacto sobre o seu aparecimento. Em ratinhos S_JL, a indução activa por imunização com MBP resultou em diversificação, mas não a transferência adoptiva de linhas celulares anti-MBP87-106 (429). Mais recentemente, JONES *et al.*, utilizando um modelo TCR transgénico anti-AcMBP1-11 (H-2^u) cruzado com ratinhos SCID (*scid/scid*), no qual não há qualquer hipótese de diversificação dada a inexistência de outros TCR capazes de reconhecer determinantes que não a AcMBP1-11, demonstraram a existência de um curso normal de doença (430). Neste caso, a focalização absoluta da resposta num único epítopo, demonstrou que a diversificação não era condição necessária, nem suficiente, para a progressão da doença, ou para a ocorrência de surtos (430). Por último, no modelo de EAE crónica com surtos em ratinhos Biozzi ABH imunizados com MOG8-21, apesar da detecção de diversificação contra outros epítopos na MOG, PLP e MBP, a resposta contra o epítopo imunizador esteve sempre presente, e foi dominante no sentido em que provocou o aparecimento de surtos (431). Todos estes dados, no seu conjunto, não negando, totalmente, a importância da diversificação de epítopos como mecanismo etiopatogénico, devem, no mínimo, por em causa a sua indispensabilidade ou universalidade.

O grande suporte factual e experimental para a existência e mecanismos da diversificação de epítopos provém, como acima apresentamos, do modelo de EAE. No que diz respeito à sua existência, e relevância, na Esclerose Múltipla, existe muito menos evidência experimental. Inicialmente, TUOHY *et al.* protagonizaram o estudo da diversificação da resposta autoimune contra a PLP em doentes com síndromes desmielinizantes monofásicos (ou surtos clínicos isolados, como vimos no Capítulo anterior) até à sua conversão em formas clinicamente definitivas de EM (415, 416, 432). Desta forma, após o diagnóstico clínico, 11 doentes foram seguidos prospectivamente durante um período de 12 a 18 meses, tendo sido realizadas múltiplas avaliações do padrão de reactividade

contra a PLP incluindo mapeamento de epítomos (432). O que estes autores encontraram foi uma grande diversidade e plasticidade na evolução do repertório T auto-reactivo; nos doentes com formas monofásicas e monocêntricas (com apenas 1 lesão detectável em RMN) a reactividade era mantida contra grandes regiões, ricas em epítomos, da PLP, e que progressivamente havia uma focalização, e modificação da resposta (*epitope focusing and shifting*) para epítomos menores e mais delimitados, e para novas regiões da PLP. Nas formas monofásicas multicêntricas (com evidência de RMN de lesões anteriores assintomáticas), observavam-se padrões de evolução de reactividade semelhantes, mas menos ordenados (432). Não foi encontrado nenhum padrão, nem nenhum epítomo imunodominante, ou seja, não foi confirmada a existência de uma hierarquia bem definida de diversificação, tal como tinha sido feito nos modelos animais (432). Posteriormente, estes mesmos autores (tal como referimos anteriormente) descobriram uma perda de reactividade contra o antigénio original na passagem de forma monofásica para EM definitiva (415, 416); em dois doentes com formas monofásicas, num caso passou-se da PLP210-244 para a PLP50-69 e, posteriormente, PLP167-185 e PLP258-271, e, noutro, da PLP116-150 para a PLP49-62, e, depois, PLP167-182. Em ambos os casos, a reactividade contra o antigénio original desapareceu, progressivamente, à medida que surgiam novas reactividades, naquilo a que se chamou imunodominância temporalmente evolutiva, ou ausência de “pecado antigénico original” (415, 418). A diversificação da reactividade para o epítomo PLP50-63 em dois doentes, pertencentes ao estudo original, mostrou não ser restrita aos antigénios de classe II HLA-DR ou DQ, mas sim ao HLA-DP (DPB1*0301), uma associação habitualmente não encontrada nesta doença (433). Neste caso, os alelos HLA-DP poderiam não ser factores de risco para o aparecimento da doença mas, sim, para a sua evolução, influenciando a capacidade da resposta imune se diversificar. Recentemente, numa tentativa de superar as dificuldades de realização de estudos humanos, foi estudada a diversificação contra a MOG utilizando ratinhos transgénicos para o HLA-DR4 (DRB1*0401) humano na ausência

de outros antígenos MHC classe II endógenos. Este modelo, como tal, é uma aproximação do que poderia ocorrer em doentes com EM possuidores deste alelo HLA; encontrou-se, neste caso, após uma resposta inicial contra a MOG97-108, uma diversificação intramolecular para a MOG181-200 e para a MBP, a primeira demonstração de diversificação envolvendo esta proteína de mielina (434).

Infelizmente, poucos outros estudos existem que abordem de forma longitudinal, ao longo do tempo, a evolução do padrão de reactividade, e que dêem suporte factual ao conceito de diversificação. GOEBELS *et al.* estudaram a evolução da dinâmica de repertório T contra a MBP em doentes com EM e em controlos normais ao longo de um período médio de 6 anos. Estes autores descobriram três padrões básicos de evolução: a) persistência de uma resposta diversificada com flutuações ao longo do tempo, b) diversificação progressiva de uma resposta inicialmente focalizada para um maior número de epítomos, e c) persistência de uma resposta focalizada ao longo do tempo (435). Destes padrões, observou-se diversificação apenas no grupo de doentes com EM, e os dois outros padrões (persistência de resposta focalizada, ou diversificada) em doentes e controlos normais (435). A descoberta de que pode existir uma resposta persistentemente focalizada contra um epítipo da MBP em indivíduos saudáveis, é evidência de que a persistência clonal contra autoantígenos é um fenómeno mais frequente que o habitualmente pensado, e não necessariamente patogénico (435). Apesar de este estudo confirmar a existência de diversificação num subgrupo de doentes, não foram encontradas diferenças clínicas significativas entre os doentes que apresentavam, ou não, diversificação, levando uma vez mais à conclusão de que este fenómeno não é necessário, nem suficiente, para explicar a evolução clínica da Esclerose Múltipla (435). Igualmente, foi possível encontrar evidência de diversificação intramolecular contra a MBP numa doente com EM estudada ao longo de 7 anos em que, apesar da evolução do seu padrão de reactividade do antígeno original (MBP16-38) contra vários outros epítomos, e da diversificação do seu repertório TCR, não houve qualquer evidência de agravamento clínico ou imagiológico durante

todo esse período (436). Num outro estudo, a que nos referimos anteriormente, desenhado para avaliar a dinâmica da evolução da resposta linfocitária contra a MBP, ao longo de 18 meses, em doentes com EM e controlos normais, foi encontrada uma maior diversidade de resposta contra a MBP na EM, mas sem qualquer padrão característico, e com flutuações cíclicas de reactividade, em que um antigénio pode ser dominante numa fase, desaparecer temporariamente e voltar a reaparecer (322). Neste trabalho foram encontrados, também, casos de evolução da doença, e ocorrência de surtos, na ausência de diversificação observável (322). Com base nestes resultados, foi proposto que para além dos modelos de diversificação da resposta, e de persistência clonal a que nos referimos, outro possível modelo seria o da flutuação cíclica da resposta T em que a hierarquia dos epítomos não tem uma evolução linear, mas sim circular com retornos periódicos a alguns epítomos dominantes (322)

Como podemos constatar, em consequência de todos os dados acima referidos, para além da heterogeneidade de apresentação e reconhecimento, a resposta linfocitária anti-mielina exhibe uma dinâmica própria, ainda imperfeitamente conhecida, na qual há lugar para vários padrões de resposta ao longo do tempo: focalização antigénica persistente, padrões cíclicos de resposta antigénica, ou diversificação de epítomos. Não é claro, por enquanto, se estes padrões são constantes ao longo do tempo para cada doente, ou se um doente pode passar por fases de estabilização, alternando com períodos de maior diversidade, e muito menos qual o impacto que estes padrões de resposta têm sobre a evolução clínica da Esclerose Múltipla.

Partindo destes pressupostos, o objectivo do desenvolvimento de terapias antigénio-específicas para esta doença torna-se mais difícil de alcançar. Em circunstâncias ideais, a existência de um único complexo trimolecular associado à doença, ou mesmo de um antigénio imunodominante universal, permite ser muito específico na abordagem terapêutica. Como veremos a seguir, várias terapêuticas antigénio-específicas muito selectivas foram desenhadas, com sucesso, ao longo do tempo. A realidade, no entanto, é que todos estes sucessos foram em modelos

experimentais em estirpes singénicas, com haplotipos HLA bem definidos, pouco variáveis no seu repertório de reconhecimento pelo TCR e, consequentemente, nos quais poucos determinantes são imunologicamente importantes. Servindo como prova-de-conceito, não se aproximam da complexidade da resposta imune na população humana, com uma enorme diversidade de alelos HLA, um repertório TCR em constante evolução, e mecanismos ainda mal conhecidos que regem a sua evolução ao longo da vida. Mais ainda, a existência de diversificação de epítomos, ou de respostas antigénicas cíclicas, significa que mesmo após a identificação de um, ou vários antígenos-alvo, estes apenas poderão ter importância num momento da evolução da doença. Neste contexto, qualquer abordagem terapêutica antígeno-específica terá de incorporar, necessariamente, o conceito de “alvo-em-movimento” descrito por TUOHY, ou então, como proposto por STEINMAN, adoptar uma estratégia de tolerização simultânea contra múltiplos antígenos, possível pelo desenvolvimento de tecnologias de tolerização tais como as vacinas de ADN (437).

7. Conclusões.

Como vimos ao longo deste capítulo, assistiu-se, durante todo o século passado, a um crescimento exponencial do nosso entendimento acerca da etiopatogénese da Esclerose Múltipla. De todas as teorias propostas ao longo dos tempos, tais como a infecciosa, tóxica e degenerativa – e cujos ecos se fazem sentir ainda hoje, e que ainda agora têm os seus defensores – houve uma evolução gradual e inexorável para uma concepção etiopatogénica da Esclerose Múltipla como o resultado de uma resposta autoimune, desregulada, contra vários componentes proteicos da mielina.

Estes componentes foram sendo identificados, em virtude da evolução das técnicas neuroquímicas e imunológicas, e da compreensão da complexidade biológica desta substância, chegando ao quadro actual em que não só várias proteínas da mielina foram identificadas como importantes antígenos, como os determinantes imunogénicos dentro de cada uma delas,

e específicos para cada espécie, foram caracterizados. A reacção autoimune contra estes alvos antigénicos será provocada, fortuitamente, pela conjugação de um estímulo ambiental de provável natureza infecciosa com indivíduos susceptíveis nos quais genes associados à resposta imune (tais como o seu repertório TCR, ou os seus alelos HLA) potenciam a autonomização dessa mesma resposta e a criação de um padrão de reactividade evolutivo contra múltiplos antigénios-alvo. Na base desta resposta imune adaptativa estará o reconhecimento antigénico, no contexto de um complexo trimolecular MHC-Ag-TCR; como vimos, as bases estruturais moleculares deste complexo têm sido progressivamente compreendidas, e levaram a conceitos como os de degenerescência de reconhecimento e de apresentação, a mimetização molecular, a identificação de resíduos-chave para a ligação ao MHC e para a estimulação linfocitária, e a diversificação de epítomos na evolução da resposta imune. Saliente-se, no entanto, que existe uma grande desigualdade na comparação entre dados provenientes dos modelos experimentais e os derivados do estudo da própria Esclerose Múltipla. À pletora de informação proveniente dos vários modelos animais de EAE, com toda a capacidade de manipulação experimental que é possível hoje em dia, opõem-se as dificuldades de realizar estudos imunológicos pormenorizados em doentes com Esclerose Múltipla. É necessária muito mais informação *top-down* (i.e., da doença para os modelos), por oposição à evidência gerada *bottom-up* (i.e., a partir dos modelos), de forma a bem caracterizar esta patologia; enquanto que a EAE é, inequivocamente, uma doença autoimune do SNC, a EM poderá, ou não, sê-lo, sendo certo, no entanto, o papel desempenhado pela resposta imune contra a mielina na sua etiopatogénese.

Com base neste acumular notável de conhecimento, tornou-se possível desenhar formas de terapia extremamente específicas, destinadas a reeducar o Sistema Imune, corrigindo padrões de reactividade anómalos e reinduzindo tolerância contra os antigénios do próprio envolvidos na resposta autoimune contra a mielina. No capítulo seguinte, iremos descrever as várias estratégias que tem sido empregues, quer nos modelos animais,

quer em ensaios clínicos, culminando com o desenvolvimento de formas de terapia baseadas na vacinação com ADN, o tema principal deste trabalho.

8. Bibliografia.

1. Cruveilhier, J. 1841. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps est susceptible. JB Baillière, Paris.
2. Carswell, R. 1838. Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease. Orme, Brown, Green & Longman, London.
3. Frerichs, F.T. 1849. Über Hirnsclerose. *Archiv des Geschichtes der Medezin* 10:334-350.
4. Compston, A. 1999. The story of Multiple Sclerosis. Churchill Livingstone, London.
5. Rindfleisch, E. 1863. Histologisches detail in der grauen degeneration von Gehirn und Rückenmark. *Virchows Archiv* 26:474-483.
6. Charcot, J.-M. 1868. Histologie de la sclerose en plaques. *Gazette Hospital (Paris)* 41:554-566.
7. Talley, C.L. 2003. The emergence of multiple sclerosis as a nosological category in France, 1838-1868. *J Hist Neurosci* 12:250-265.
8. Rascol, A., and M. Clanet. 1982. [Multiple sclerosis From Charcot and Vulpian to the present time]. *Rev Neurol (Paris)* 138:921-930.
9. Moreira, M.A., C.P. Tilbery, M.A. Lana-Peixoto, M.F. Mendes, D.R. Kaimen-Maciel, and D. Callegaro. 2002. [Historical aspects of multiple sclerosis]. *Rev Neurol* 34:379-383.
10. Swiderski, R.M. 1998. Multiple Sclerosis throughout history and human life. McFarland & Company Inc., Publishers, London.
11. Murray, T. 2005. Multiple Sclerosis: the history of a disease. Demos Medical Publishing. 592 pp.
12. Charcot, J.-M. 1868. Comptes rendus des sceances et memoires lus a la Société de Biologie. *Comp Rend Soc Biol* 20:13-14.
13. Vulpian, E.F.A. 1866. Note sur la sclérose en plaques de la moelle épinière. *Un Med Prat Franc* 30:459-465.
14. Valentiner, T. 1856. Über die Sclerose des Gehirns und Rückenmarks. *Deutsche Klinik* 14:147.
15. Almeida Lima, P.M. 1954. Epilepsia Jacksoniana, sintoma dominante de alguns casos de esclerose em placas. In Colectânea de trabalhos médicos de discípulos de Pulido Valente. F. Wohlwill, editor. Livraria Luso-Espanhola, Lisboa. 417-430.
16. Talley, C. 2004. The history of the (re)naming of multiple sclerosis. *J Hist Neurosci* 13:351.
17. Ferreira de Moura, V. 1872. A Sclerose em Placas Disseminadas. *J Soc Sc Med Lisb* 2.s.:33; 65; 97; 161; 193; 257.
18. Abreu Freire, A.d. 1895. Nota sobre um caso de esclerose em placas acompanhado de emphysema pulmonar. *Coimbra Med*:566; 576.
19. Almeida Lima, P.M. 1959. Virgílio Machado: no centenário do seu nascimento. *Sep Bol Academia Ciências Lisboa* 31:1-23.
20. Monteiro, A.C. 1927. Un sábio português : o professor Virgílio Machado. *Archeion* 8:1-7.
21. Machado, V. 1897. Esclerose em Placas. *Rev Port Med Cirurg Prat* 1:1-6.
22. Bombarda, M. 1908. Casos de Esclerose em Placas, Esclerose Difusa e Loucura Epileptica com symptomas ainda não descriptos. *Med Contemp* xxvi:172; 182.
23. Earp, A.S. 1882. Do diagnóstico e tratamento da Esclerose em Placas difusa cerebro-espinhal. Irmão e Souza Lima, Rio de Janeiro.
24. Silverstein, A. 1989. A History of Immunology. Academic Press. 422 pp.
25. Stites, D.P.S., J.D. Wells, J.V. 1987. Basic and Clinical Immunology. Prentice-Hall International. 734 pp.
26. Tauber, A.I.C., L. 1991. Metchnikoff and the Origins of Immunology : From Metaphor to Theory. Oxford University Press. 280 pp.
27. Bramwell, B. 1904. On Disseminated Sclerosis, with special reference to the frequency and etiology of the disease. *Q J Clin Med* 2:193-210.
28. Marie, P. 1891. Traité de Médecine. Masson, Paris.
29. Muller, E. 1904. Die Multiple Sklerose des Gehirns und Rückenmarks, Jena.
30. Maglione, P.J. 2005. Fifteen century saints, nineteenth century neurologists and twentieth century immunotherapy: the eccentric history of Multiple Sclerosis. *Einstein J Biol Med* 21:73-77.

31. Charcot, J.-M. 1876. Leçons sur les localisations dans les maladies du cerveau et de la moelle épinière. A. Delahaye & Lecrosnier, Paris.
32. Charcot, J.-M. Maladies du système nerveux. 216 pp.
33. Babinski, J. 1885. Etude anatomique et clinique sur la sclérose en plaques. Masson, Paris.
34. Bullock, W.E. 1913. The experimental transmission of disseminated sclerosis to rabbits. *Lancet* 182:1185-1186.
35. Perron, H., J.A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P.W. Tuke, C. Voisset, J.L. Blond, B. Lalande, J.M. Seigneurin, and B. Mandrand. 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7583-7588.
36. Nowak, J., D. Januszkiewicz, M. Pernak, I. Liwen, M. Zawada, J. Rembowska, K. Nowicka, K. Lewandowski, H. Hertmanowska, and M. Wender. 2003. Multiple sclerosis-associated virus-related pol sequences found both in multiple sclerosis and healthy donors are more frequently expressed in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol* 9:112-117.
37. Garson, J.A., P.W. Tuke, P. Giraud, G. Paranhos-Baccala, and H. Perron. 1998. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 351:33.
38. Farquhar Buzzard, E. 1911. The treatment of disseminated sclerosis: a suggestion. *Lancet* 177:98.
39. Kuhn, P., Steiner, G. 1917. Über Die Ursache der M.S. *Med Klinik* 13:1007.
40. Steiner, G. 1952. Acute plaques in multiple sclerosis, their pathogenetic significance and the role of spirochetes as etiological factor. *J Neuropathol Exp Neurol* 11:343-372.
41. Steiner, G. 1954. Morphology of Spirochaeta myelophthora in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 13:221-229.
42. Needham, G.M., R.E. Yoss, and D. Daly. 1958. Failure to isolate Spirochaeta myelophthora (Steiner) from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 33:395-402.
43. Chu, T.W., E.D. Delamater, and S. Feldman. 1960. [Non-occurrence of spirochetes in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.]. *Proc Soc Exp Biol Med* 104:353.
44. Scherrer, R., E. Mattmann, and R. Wuethrich. 1962. [On the problem of the demonstration of spirochetes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients.]. *Schweiz Med Wochenschr* 92:911-915.
45. Gay, D., and G. Dick. 1986. Is multiple sclerosis caused by an oral spirochaete? *Lancet* 2:75-77.
46. Marshall, V. 1988. Multiple sclerosis is a chronic central nervous system infection by a spirochetal agent. *Med Hypotheses* 25:89-92.
47. Halperin, J.J. 2003. Lyme disease and the peripheral nervous system. *Muscle Nerve* 28:133-143.
48. Halperin, J.J. 1998. Nervous system Lyme disease. *J Neurol Sci* 153:182-191.
49. Fritzsche, M. 2005. Chronic Lyme borreliosis at the root of multiple sclerosis--is a cure with antibiotics attainable? *Med Hypotheses* 64:438-448.
50. Nachman, S.A., and L. Pontrelli. 2003. Central nervous system Lyme disease. *Semin Pediatr Infect Dis* 14:123-130.
51. Chevassut, K. 1930. The aetiology of disseminated sclerosis. *Lancet* 215:552-560.
52. Purves-Stewart, J. 1930. A specific vaccine treatment in disseminated sclerosis. *Lancet* 215:560-564.
53. Carmichael, E.A. 1931. The aetiology of disseminated sclerosis: some criticisms of recent work especially with regard to the "Spherula insularis". *Proc R Soc Med* 34:591-599.
54. Purves-Stewart, J. 1931. Disseminated sclerosis: experimental vaccine treatment. *Lancet* 217:440-441.
55. Dawson, J.W. 1916. The histology of disseminated sclerosis. *Trans R Soc Edinb* 1:517-540.
56. Casetta, I., M. Invernizzi, and E. Granieri. 2001. Multiple sclerosis and dental amalgam: case-control study in Ferrara, Italy. *Neuroepidemiology* 20:134-137.
57. McGrother, C.W., C. Dugmore, M.J. Phillips, N.T. Raymond, P. Garrick, and W.O. Baird. 1999. Multiple sclerosis, dental caries and fillings: a case-control study. *Br Dent J* 187:261-264.
58. Bangsi, D., P. Ghadirian, S. Ducic, R. Morisset, S. Ciccocioppo, E. McMullen, and D. Krewski. 1998. Dental amalgam and multiple sclerosis: a case-control study in Montreal, Canada. *Int J Epidemiol* 27:667-671.
59. Clausen, J. 1993. Mercury and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 87:461-464.
60. Brickner, R.M. 1931. Studies of the pathogenesis of Multiple Sclerosis. II. Evidence of the presence of an abnormal lipase in the blood in Multiple Sclerosis. *Bull Neurol Inst NY* 1:105-135.

61. Putnam, T.J., J.B. McKenna, and L.R. Morrison. 1931. Studies in Multiple Sclerosis: I. The histogenesis of experimental Multiple Sclerosis plaques and their relation to Multiple Sclerosis. *J Am Med Ass* 97:1591-1596.
62. Putnam, T.J., J.B. McKenna, and J. Evans. 1932. Experimental Multiple Sclerosis in dogs from injections of tetanus toxin. *J Psychiatry Neurol* 44:460-471.
63. Putnam, T.J. 1935. Studies in Multiple Sclerosis: IV. "Encephalitis" and sclerotic plaques produced by venular obstruction. *Arch Neurol Psychiat* 33:929.
64. Putnam, T.J., V. Ludwig, H.H. Chiavacci, and H.G. Weitzen. 1940. Results of treatment of Multiple Sclerosis with dicoumarin. *Arch Neurol Psychiat* 57:3-11.
65. Furtado, D., and E. Teixeira de Sousa. 1937. Encefalomielite disseminada. *Sep Rev Clin Hig Hidrol*:338-346.
66. McAlpine, D. 1931. Acute disseminated encephalomyelitis: its sequelae and its relationship to disseminated sclerosis. *Lancet* 217:846-852.
67. Pette, H. 1928. Klinische und anatomische Studien. Über die Pathogenese der multiplen Sklerose. *Dtsch Zschr Nervenheilk* 105:76.
68. Pette, H. 1936. Zur Ätiologie und Pathogenese der multiplen Sklerose. *Med Klinik* 2:1138.
69. Glanzmann, E. 1927. Die Nervösen Komplikationen der Varizellen der Variola und Vakzine. *Schweiz Med Wochenschr* 57:145-154.
70. Van Bogaert, L. 1932. Histopathologische Studie über die Encephalitis nach Windpocken (Encephalitis postvaricellosa). *Zschr Ges Neurol Psychiat* 140:201.
71. Van Bogaert, L., and J. Busscher. 1939. Sur la sclerose inflammatoire de la substance blanche des hemispheres. *Rev Neurol* 71:679-701.
72. Van Bogaert, L. 1932. Essai d'interpretation des manifestations nerveuses observées au cours de la vaccination de la maladie sérique et des maladies eruptives. *Rev Neurol* 2:1.
73. Marburg, O. 1932. Allgemeine Pathologie der nichteitrigen Entzündungen des Zentralnervensystems. *Dtsch Zschr Nervenheilk* 124:37.
74. Furtado, D., and V. Chichorro. 1946. Ensaios de tratamento da esclerose em placas. *Sep J Med VIII*:157-165.
75. Johnson, R.T., D.E. Griffin, R.L. Hirsch, J.S. Wolinsky, S. Roedenbeck, I. Lindo de Soriano, and A. Vaisberg. 1984. Measles encephalomyelitis--clinical and immunologic studies. *N Engl J Med* 310:137-141.
76. Laveran, A. 1879. Rage. In *Nouveaux éléments de pathologie et de clinique*. A. Laveran and J. Teissier, editors. JB Baillière, Paris. 183-193.
77. França, C. 1900. O diagnóstico da raiva pelo exame histológico dos centros nervosos de animais mortos prematuramente. *Rev Port Med Cirurg Prat* IX:97-103.
78. França, C. 1901. Trabalhos sobre a raiva. *Rev Port Med Cirurg Prat* X:321-334.
79. França, C. 1910. Du danger de l'emploi des moelles plus virulentes dans le traitement de la rage. *Centralbl Bakt Jena* LV:154.
80. Stuart, G., and K.S. Krikorian. 1928. The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann Trop Med* 23:327-377.
81. Remlinger, P. 1905. Accidents paralytiques au cours du traitement antirabique. *Ann Inst Pasteur* 09:625.
82. Muller, E. 1908. Über acute paraplegien nach wutschutzimpfung. *Zeitsch f. Nervenheilkunde* 34:252-278.
83. Stuart, G., and K.S. Krikorian. 1930. A fatal neuro-paralytic accident of antirabies treatment. *Lancet* 215:1123-1125.
84. Remlinger, P. 1937. Deux cent deux accidents paralytiques dus traitement antirabique. *Bull Acad Nat Med* 118:419-432.
85. McFadzean, J.S. 1952. Neuroparalytic accidents of rabies vaccination. *Bull Hong Kong Chin Med Ass* 4:36-42.
86. Harvey, W.F., and H.W. Acton. 1923. An examination into the degree of efficacy of anti-rabic treatment. *Ind J Med Res* 10:1020-1077.
87. Aujeszkzy, A. 1900. Ueber Immunisierung gegen Wut mit normaler Nervensubstanz. *Centralbl Bakt Jena* 27:5-10.
88. Centanni, E. 1898. Sui prodotti tossici secondari nelle infezioni. *Rif Medica* III:637-644.
89. Harvey, W.F., and A. McKendrick. 1908. The theory and practice of anti-rabic immunization, Calcutta. 43 pp.
90. Remlinger, P. 1919. Accidents paralytiques d'origine médullaire provoqués chez le lapin par des inoculations de substance nerveuse normale homologue. *Compte Rendu Soc Biol* 83:171-173.
91. Getzowa, S., G. Stuart, and K.S. Krikorian. 1933. Pathological changes observed in paralysis of the Landry type: a contribution to the histology of neuro-paralytic accidents complicating anti-rabic treatment. *J Pathol Bacteriol* 37:483-500.

92. Schweinburg, F. 1924. Klinische und experimentelle Beobachtungen über Lahmungen nach Wutschutzimpfung. *Wien Klin Wochenschr* XXXVII:797-801.
93. Koritschoner, R., and F. Schweinburg. 1925. Klinische und experimentelle Beobachtungen über Lahmungen nach Wutschutzimpfung. *Zeitsch f. Immunitatsf u.Experimentelle Therapie* XLII:217-283.
94. Miyagawa, Y., and S. Ishii. 1926. On the influence of the constituents of central nerve cells parenterally injected on the living organism. *Sci Rep Gov Inst Infect Dis Tokyo* 5:331-371.
95. Miyagawa, Y. 1923. On the biological function of the constituents of the dead cells. A new theory on the process of the physiological function of living organism and of man. *Sci Rep Gov Inst Infect Dis Tokyo* 2:375-395.
96. Weston Hurst, E. 1932. The effects of the injection of normal brain emulsion into rabbits, with special reference to the aetiology of the paralytic accidents of antirabic treatment. *J Hygiene* 32:33-44.
97. Steinman, L. 2003. Optic neuritis, a new variant of experimental encephalomyelitis, a durable model for all seasons, now in its seventieth year. *J Exp Med* 197:1065-1071.
98. Epps, V. 2005. Thomas Rivers and the EAE model. *J Exp Med* 202:4.
99. Corner, G.W. 1964. A History of the Rockefeller Institute 1901-1953. Origins and growth. Rockefeller Institute Press, New York.
100. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry. 1933. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58:39-53.
101. Brandt, R., H. Guth, and R. Muller. 1926. Zur frage der Organspezifität von Lipoidantikörpern. *Klin Wchnschr* 5:655.
102. Witebsky, E., and J. Steinfeld. 1928. Untersuchungen über spezifische Antigenfunktionen von Organen. *Zeitsch f. Immunitatsf u.Experimentelle Therapie* 58:271-296.
103. Schwentker, F.F., and T.M. Rivers. 1934. The antibody response of rabbits to injections of emulsions and extracts of homologous brain. *J Exp Med* 60:559-574.
104. Lewis, J.H. 1933. The immunologic specificity of brain tissue. *J Immunol* 24:193-211.
105. Rivers, T.M., and F.F. Schwentker. 1935. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med* 61.
106. Ferraro, A., and G.A. Jervis. 1940. Experimental disseminated encephalopathy in the monkey. *Archives of Neurology and Psychiatry* 43:195-209.
107. Delezenne, C. 1900. Sérums nèvrotoxiques. *Ann Inst Pasteur* 14:686-704.
108. Armand-Delille, P.-F. 1906. Contribution a l'étude des sérums nèvrotoxiques et des lésions qu'ils provoquent. *Ann Inst Pasteur* 20:838-858.
109. Davidoff, L.M., B.C. Seegal, and D. Seegal. 1932. The Arthus phenomenon. Local anaphylactic inflammation in the rabbit brain. *J Exp Med* 55:163-168.
110. Jervis, G.A., A. Ferraro, L.M. Kopeloff, and N. Kopeloff. 1941. Neuropathologic changes associated with experimental anaphylaxis in the monkey. *Archives of Neurology and Psychiatry* 45:733-751.
111. Jervis, G.A. 1943. Forssman's "carotid syndrome", a contribution to the study of anaphylactic changes in the nervous system from the standpoint of pathology. *Arch Pathol* 35:560-570.
112. Baker, J.R., G.R. Bullock, K.D. Butler, I.H. Williamson, and A.M. White. 1985. An ultrastructural analysis of the vascular damage in the lethal and sublethal Forssman reaction in the guinea-pig. *Br J Exp Pathol* 66:709-718.
113. Tsukada, N., S. Ansar Ahmed, W.M. Behan, and P.O. Behan. 1986. Similarities between the Forssman carotid syndrome and experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)* 69:234-243.
114. Ferraro, A. 1944. Pathology of demyelinating diseases as an allergic reaction of the brain. *Archives of Neurology and Psychiatry* 52:443-483.
115. Bailey, G.H., and R.E. Gardner. 1940. The tissue specificity of brain and medullated nerves as shown by passive anaphylaxis in guinea pigs. *J Exp Med* 72:499-510.
116. Lewis, P.A., and D. Loomis. 1926. Allergic irritability: III. The influence of chronic infections and of trypan blue on the formation of specific antibodies. *J Exp Med* 43:121-131.
117. Dienes, L. 1928. Further observations concerning sensitization of tuberculous guinea pigs. *J Immunol* 15:153.
118. Freund, J., and M.V. Bonato. 1944. The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacilli on immunization with diptheria toxoid and Bact. typhosum. *J Immunol* 48:325.
119. Freund, J., and K.J. Thomson. 1945. A simple rapid technic of preparing water-in-oil emulsions of penicillin, drugs and biologicals. *Science* 101:468-469.
120. Kopeloff, L.M., and N. Kopeloff. 1944. The production of antibrain antibodies in the monkey. *J Immunol* 48:297-304.

121. Kabat, E.A., A. Wolf, and B. A.E. 1947. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in Rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J Exp Med* 85:117-130.
122. Weston Hurst, E. 1941. Acute hemorrhagic leukoencephalitis: a previously undefined entity. *Med J Aust* 2:1-6.
123. Ravkina, L., I. Harib, Z. Manovitch, E. Deconenko, E. Letchinskaja, and E. Papilova. 1979. Hyperacute experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys as a model of acute necrotizing hemorrhagic encephalomyelitis. *J Neurol* 221:113-125.
124. Wolf, A., E.A. Kabat, and B. A.E. 1947. The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the Rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 6:333-357.
125. Kabat, E.A., A. Wolf, and A.E. Bezer. 1948. Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in Rhesus monkeys III. *J Exp Med*:417-425.
126. Paterson, P.Y. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 111:119-136.
127. Kabat, E.A., A. Wolf, and A.E. Bezer. 1949. Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in Rhesus monkeys. IV. Disseminated encephalomyelitis produced in monkeys with their own brain tissue. *J Exp Med* 89:395-398.
128. Morgan, I.M. 1947. Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J Exp Med* 84:131-140.
129. Morrison, L.R. 1947. Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. *Arch Neurol and Psychiatry* 58:391-416.
130. Freund, J., E.R. Stern, and T.M. Pisani. 1947. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J Immunol* 57:179-194.
131. Jervis, G.A., and H. Koprowski. 1948. Experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 8:309-320.
132. Olitsky, P.K., and R.H. Yager. 1949. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J Exp Med* 90:213-224.
133. Olitsky, P.K., and J.M. Lee. 1953. Biological properties and variations of reactions of the encephalitogenic agent in nervous tissues. *J Immunol* 71:419-425.
134. Lee, J.M., and P.K. Olitsky. 1955. Simple method for enhancing development of acute disseminated encephalomyelitis in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 89:263-266.
135. Bernard, C.C., and P.R. Carnegie. 1975. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins. *J Immunol* 114:1537-1540.
136. Lipton, M.M., and J. Freund. 1952. Encephalomyelitis in the rat following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. *Proc Soc Exp Biol Med* 81:260-261.
137. Ferraro, A., and C.L. Cazzullo. 1948. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol* 7:235-260.
138. Freund, J., M.M. Lipton, and L.R. Morrison. 1950. Demyelination in the guinea pig in chronic allergic encephalomyelitis produced by injecting guinea pig brain in oil emulsion containing a variant of mycobacterium butyricum. *Arch Pathol (Chic)* 50:108-121.
139. Lumsden, C.E. 1949. Experimental "allergic" encephalomyelitis. *Brain* 72:198-226.
140. Lumsden, C.E. 1949. Experimental "allergic" encephalomyelitis. II. On the nature of the encephalitogenic agent. *Brain* 72:517-537.
141. Stevenson, L.D., and E.C. Alvord. 1947. Allergy in the nervous system. A review of the literature. *Am J Med* 2:614-620.
142. Thomas, L., P.Y. Paterson, and B. Smithwick. 1950. Acute disseminated encephalomyelitis following immunization with homologous brain extracts; studies on the role of a circulating antibody in the production of the condition in dogs. *J Exp Med* 92:133-152.
143. Kibler, R.F., and A.E. Barnes. 1962. Antibody studies in rabbit encephalomyelitis induced by a water-soluble protein fraction of rabbit cord. *J Exp Med* 116:807-825.
144. Cohen, S., and R. Bannister. 1967. Immunoglobulin synthesis within the central nervous system in disseminated sclerosis. *Lancet* 1:366-367.
145. Bornstein, M.B., and S.H. Appel. 1959. Demyelination in cultures of rat cerebellum produced by experimental allergic encephalomyelitic serum. *Trans Am Neurol Assoc* 84:165-166.
146. Bornstein, M.B., and S.H. Appel. 1961. The application of tissue culture to the study of experimental "allergic" encephalomyelitis. I. Patterns of demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 20.
147. Appel, S.H., and M.B. Bornstein. 1964. The Application of Tissue Culture to the Study of Experimental Allergic Encephalomyelitis. II. Serum Factors Responsible for Demyelination. *J Exp Med* 119:303-312.

148. Dowling, P., and S. Cook. 1968. The in vitro synthesis of a demyelinating factor by circulating immunocytes in EAE. *Neurology* 18:295-296.
149. Seil, F.J., G.A. Falk, M.W. Kies, and E.C. Alvord, Jr. 1968. The in vitro demyelinating activity of sera from guinea pigs sensitized with whole CNS and with purified encephalitogen. *Exp Neurol* 22:545-555.
150. Paterson, P.Y. 1966. Experimental allergic encephalomyelitis and autoimmune disease. *Adv Immunol* 5:131-208.
151. Arnason, B.G., B.D. Jankovic, B.H. Waksman, and C. Wennersten. 1962. Role of the thymus in immune reactions in rats. II. Suppressive effect of thymectomy at birth on reactions of delayed (cellular) hypersensitivity and the circulating small lymphocyte. *J Exp Med* 116:177-186.
152. Lipton, M.M., and J. Freund. 1953. The transfer of experimental allergic encephalomyelitis in the rat by means of parabiosis. *J Immunol* 71:380-384.
153. Paterson, P.Y. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 111:119-136.
154. Stone, S.H. 1961. Transfer of allergic encephalomyelitis by lymph node cells in inbred guinea pigs. *Science* 134:619-620.
155. Stone, S.H., E.M. Lerner, 2nd, and J.H. Goode. 1968. Adoptive autoimmune encephalomyelitis in inbred guinea pigs: immunological and histological aspects. *Science* 159:995-997.
156. Falk, G.A., M.W. Kies, and E.C. Alvord, Jr. 1968. Delayed hypersensitivity to myelin basic protein in the passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 101:638-644.
157. Hashem, N., and M.L. Barr. 1963. Mitogenic Effect of Rabies Vaccine on Cultures of Lymphocytes in Diseases of the Nervous System. *Lancet* 13:1029-1030.
158. Behan, P.O., N. Geschwind, J.B. Lamarche, R.P. Lisak, and M.W. Kies. 1968. Delayed hypersensitivity to encephalitogenic protein in disseminated encephalomyelitis. *Lancet* 2:1009-1012.
159. Hughes, D., E.A. Caspary, and E.J. Field. 1968. Lymphocyte transformation induced by encephalitogenic factor in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet* 2:1205-1207.
160. Brody, J.A., M.M. Harlem, J.F. Kurtzke, and L.R. White. 1968. Unsuccessful attempt to induce transformation by cerebrospinal fluid in cultured lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 279:202-204.
161. Sena, A. 1984. Membranas, mielinização e desmielinização no sistema nervoso central. In Departamento de Bioquímica. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
162. Olitsky, P.K., and C. Tal. 1951. Certain properties of the causal agent of experimental disseminated encephalomyelitis in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 78:607-610.
163. Folch, J., and M. Lees. 1951. Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J Biol Chem* 191:807-817.
164. Waksman, B.H., H. Porter, M.D. Lees, R.D. Adams, and J. Folch. 1954. A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit. *J Exp Med* 100:451-471.
165. Olitsky, P.K., and C. Tal. 1952. Acute disseminated encephalomyelitis produced in mice by brain proteolipide (Folch-Lees). *Proc Soc Exp Biol Med* 79:50-53.
166. Tal, C., and P.K. Olitsky. 1952. The chemical nature of encephalitogenic proteolipide A and B. *Proc Soc Exp Biol Med* 81:590-593.
167. Tal, C., and P.K. Olitsky. 1952. Quantitative studies on proteolipide as incitant of disseminated encephalomyelitis in mice. *Science* 116:420-421.
168. Roboz, E., N. Henderson, and M.W. Kies. 1958. A collagen-like compound isolated from bovine spinal cord. I. *J Neurochem* 2:254-260.
169. Kies, M.W., E.C. Alvord, Jr., and E. Roboz. 1958. The allergic encephalomyelitic activity of a collagen-like compound from bovine spinal cord. II. *J Neurochem* 2:261-264.
170. Einstein, E.R., D.M. Robertson, J.M. Dicaprio, and W. Moore. 1962. The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity. *J Neurochem* 9:353-361.
171. Robertson, D.M., R. Blight, and C.E. Lumsden. 1962. Dialysable peptide as the causative factor in experimental "allergic" encephalomyelitis. *Nature* 196:1005.
172. Carnegie, P.R., and C.E. Lumsden. 1966. Encephalitogenic peptides from spinal cord. *Nature* 209:1354-1355.
173. Carnegie, P.R., and C.E. Lumsden. 1967. Fractionation of encephalitogenic polypeptides from bovine spinal cord by gel filtration in phenol-acetic acid-water. *Immunology* 12:133-145.
174. Kies, M.W., E.B. Thompson, and E.C. Alvord, Jr. 1965. The Relationship of Myelin Proteins to Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 122:148-160.

175. Kibler, R.F., R.H. Fox, and R. Shapira. 1964. Isolation of a Highly Purified Encephalitogenic Protein from Bovine Cord. *Nature* 204:1273-1275.
176. Wolfgram, F. 1965. Macromolecular Constituents of Myelin. *Ann N Y Acad Sci* 122:104-115.
177. Caspary, E.A., and E.J. Field. 1965. An Encephalitogenic Protein of Human Origin: Some Chemical and Biological Properties. *Ann N Y Acad Sci* 122:182-198.
178. Caspary, E.A., and E.J. Field. 1963. Encephalitogenic factor in experimental "allergic" encephalomyelitis. *Nature* 197:1218.
179. Field, E.J., E.A. Caspary, and E.J. Ball. 1963. Some biological properties of a highly active encephalitogenic factor isolated from human brain. *Lancet* 2:11-13.
180. Laatsch, R.H., M.W. Kies, S. Gordon, and E.C. Alvord, Jr. 1962. The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J Exp Med* 115:77-88.
181. Rauch, H.C., and S. Raffel. 1964. Immunofluorescent Localization of Encephalitogenic Protein in Myelin. *J Immunol* 92:452-455.
182. Nakao, A., W.J. Davis, and E.R. Einstein. 1966. Basic proteins from the acidic extract of bovine spinal cord. II. Encephalitogenic, immunologic and structural inter-relationships. *Biochim Biophys Acta* 130:171-179.
183. Kibler, R.F., and R. Shapira. 1968. Isolation and properties of an encephalitogenic protein from bovine, rabbit, and human central nervous system tissue. *J Biol Chem* 243:281-286.
184. Eylar, E.H., J. Salk, G.C. Beveridge, and L.V. Brown. 1969. Experimental allergic encephalomyelitis. An encephalitogenic basic protein from bovine myelin. *Arch Biochem Biophys* 132:34-48.
185. Eylar, E.H. 1970. Amino acid sequence of the basic protein of the myelin membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:1425-1431.
186. Eylar, E.H., S. Brostoff, G. Hashim, J. Caccam, and P. Burnett. 1971. Basic A1 protein of the myelin membrane. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 246:5770-5784.
187. Hashim, G.A., and E.H. Eylar. 1969. Allergic encephalomyelitis: isolation and characterization of encephalitogenic peptides from the basic protein of bovine spinal cord. *Arch Biochem Biophys* 129:645-654.
188. Eylar, E.H., and G.A. Hashim. 1968. Allergic encephalomyelitis: the structure of encephalitogenic determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:644-650.
189. Merrifield, R.B., and J.M. Stewart. 1965. Automated peptide synthesis. *Nature* 207:522-523.
190. Merrifield, R.B., J.M. Stewart, and N. Jernberg. 1966. Instrument for automated synthesis of peptides. *Anal Chem* 38:1905-1914.
191. Eylar, E.H., J. Caccam, J.J. Jackson, F.C. Westall, and A.B. Robinson. 1970. Experimental allergic encephalomyelitis: synthesis of disease-inducing site of the basic protein. *Science* 168:1220-1223.
192. Westall, F.C., A.B. Robinson, J. Caccam, J. Jackson, and E.H. Eylar. 1971. Essential chemical requirements for induction of allergic encephalomyelitis. *Nature* 229:22-24.
193. Hashim, G.A., and R.D. Sharpe. 1975. Non-encephalitogenic synthetic analogues of the determinant for allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *Nature* 255:484-485.
194. Barton, M.A., T.A. McPherson, R.U. Lemieux, and G.O. Bain. 1972. Experimental allergic encephalomyelitis (E.A.E.): synthesis of the 7-11, 11-20, and 12-20 peptides of human encephalitogenic protein and inhibition of histological E.A.E. by the 12-20 peptide. *Can J Biochem* 50:689-696.
195. Kibler, R.F., R. Shapira, S. McKneally, J. Jenkins, P. Selden, and F. Chou. 1969. Encephalitogenic protein: structure. *Science* 164:577-580.
196. Eylar, E.H., F.C. Westall, and S. Brostoff. 1971. Allergic encephalomyelitis. An encephalitogenic peptide derived from the basic protein of myelin. *J Biol Chem* 246:3418-3424.
197. Shapira, R., F.C. Chou, S. McKneally, E. Urban, and R.F. Kibler. 1971. Biological activity and synthesis of an encephalitogenic determinant. *Science* 173:736-738.
198. Eylar, E.H., S. Brostoff, J. Jackson, and H. Carter. 1972. Allergic encephalomyelitis in monkeys induced by a peptide from the A1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:617-619.
199. McFarlin, D.E., S.E. Blank, R.F. Kibler, S. McKneally, and R. Shapira. 1973. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat: response to encephalitogenic proteins and peptides. *Science* 179:478-480.
200. McFarlin, D.E., S.C. Hsu, S.B. Slemenda, F.C. Chou, and R.F. Kibler. 1975. The immune response against myelin basic protein in two strains of rat with different genetic capacity to develop experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 141:72-81.
201. Chou, C.H., F.C. Chou, T.J. Kowalski, R. Shapira, and R.F. Kibler. 1977. The major site of guinea-pig myelin basic protein encephalitogenic in Lewis rats. *J Neurochem* 28:115-119.
202. Kibler, R.F., R.B. Fritz, F. Chou, C.H. Jen Chou, N.Y. Peacocke, N.M. Brown, and D.E. McFarlin. 1977. Immune response of Lewis rats to peptide C1 (residues 68-88) of guinea pig and rat myelin basic proteins. *J Exp Med* 146:1323-1331.

203. Hashim, G.A. 1977. Experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats: chemical synthesis of disease-inducing determinant. *Science* 196:1219-1221.
204. Hashim, G.A., E.F. Carvalho, and R.D. Sharpe. 1978. Definition and synthesis of the essential amino acid sequence for experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J Immunol* 121:665-670.
205. Chou, C.H., R.B. Fritz, F.C. Chou, and R.F. Kibler. 1979. The immune response of Lewis rats to peptide 68-88 of guinea pig myelin basic protein. I. T cell determinants. *J Immunol* 123:1540-1543.
206. Mannie, M.D., P.Y. Paterson, D.C. U'Prichard, and G. Flouret. 1985. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats with purified synthetic peptides: delineation of antigenic determinants for encephalitogenicity, in vitro activation of cellular transfer, and proliferation of lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5515-5519.
207. Fritz, R.B., C.H. Chou, and D.E. McFarlin. 1983. Relapsing murine experimental allergic encephalomyelitis induced by myelin basic protein. *J Immunol* 130:1024-1026.
208. Lublin, F.D., P.H. Maurer, R.G. Berry, and D. Tippett. 1981. Delayed, relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Immunol* 126:819-822.
209. Brown, A.M., and D.E. McFarlin. 1981. Relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *Lab Invest* 45:278-284.
210. Fritz, R.B., C.H. Chou, and D.E. McFarlin. 1983. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J and (SJL/J x PL/J)F1 mice by myelin basic protein and its peptides: localization of a second encephalitogenic determinant. *J Immunol* 130:191-194.
211. Levine, S., and R. Sowinski. 1973. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *J Immunol* 110:139-143.
212. Munoz, J.J., C.C. Bernard, and I.R. Mackay. 1984. Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. *Cell Immunol* 83:92-100.
213. Shaw, M.K., C. Kim, K.L. Ho, R.P. Lisak, and H.Y. Tse. 1992. A combination of adoptive transfer and antigenic challenge induces consistent murine experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice and other reputed resistant strains. *J Neuroimmunol* 39:139-149.
214. Pettinelli, C.B., and D.E. McFarlin. 1981. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* 127:1420-1423.
215. Pettinelli, C.B., R.B. Fritz, C.H. Chou, and D.E. McFarlin. 1982. Encephalitogenic activity of guinea pig myelin basic protein in the SJL mouse. *J Immunol* 129:1209-1211.
216. Zamvil, S.S., D.J. Mitchell, A.C. Moore, K. Kitamura, L. Steinman, and J.B. Rothbard. 1986. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* 324:258-260.
217. Zamvil, S.S., D.J. Mitchell, A.C. Moore, A.J. Schwarz, W. Stiefel, P.A. Nelson, J.B. Rothbard, and L. Steinman. 1987. T cell specificity for class II (I-A) and the encephalitogenic N-terminal epitope of the autoantigen myelin basic protein. *J Immunol* 139:1075-1079.
218. Sakai, K., S.S. Zamvil, D.J. Mitchell, M. Lim, J.B. Rothbard, and L. Steinman. 1988. Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 19:21-32.
219. Kono, D.H., J.L. Urban, S.J. Horvath, D.G. Ando, R.A. Saavedra, and L. Hood. 1988. Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Exp Med* 168:213-227.
220. Zamvil, S.S., D.J. Mitchell, M.B. Powell, K. Sakai, J.B. Rothbard, and L. Steinman. 1988. Multiple discrete encephalitogenic epitopes of the autoantigen myelin basic protein include a determinant for I-E class II-restricted T cells. *J Exp Med* 168:1181-1186.
221. Yamamura, T., T. Namikawa, M. Endoh, T. Kunishita, and T. Tabira. 1986. Passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid apoprotein. *J Neurol Sci* 76:269-275.
222. van der Veen, R.C., R.A. Sobel, and M.B. Lees. 1986. Chronic experimental allergic encephalomyelitis and antibody responses in rabbits immunized with bovine proteolipid apoprotein. *J Neuroimmunol* 11:321-333.
223. Williams, R.M., M.B. Lees, F. Cambi, and W.B. Macklin. 1982. Chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine white matter proteolipid apoprotein. *J Neuropathol Exp Neurol* 41:508-521.
224. Cambi, F., M.B. Lees, R.M. Williams, and W.B. Macklin. 1983. Chronic experimental allergic encephalomyelitis produced by bovine proteolipid apoprotein: immunological studies in rabbits. *Ann Neurol* 13:303-308.
225. Sobel, R.A., R.C. van der Veen, and M.B. Lees. 1986. The immunopathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine proteolipid protein. *J Immunol* 136:157-163.

226. Hashim, G.A., D.D. Wood, and M.A. Moscarello. 1980. Myelin lipophilin-induced experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *Prog Clin Biol Res* 39:21-39.
227. Hashim, G.A., D.D. Wood, and M.A. Moscarello. 1980. Myelin lipophilin-induced demyelinating disease of the central nervous system. *Neurochem Res* 5:1137-1145.
228. Yoshimura, T., T. Kunishita, K. Sakai, M. Endoh, T. Namikawa, and T. Tabira. 1985. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs induced by proteolipid protein. *J Neurol Sci* 69:47-58.
229. Yamamura, T., T. Namikawa, M. Endoh, T. Kunishita, and T. Tabira. 1986. Experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid apoprotein in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 12:143-153.
230. Endoh, M., T. Tabira, T. Kunishita, K. Sakai, T. Yamamura, and T. Taketomi. 1986. DM-20, a proteolipid apoprotein, is an encephalitogen of acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Immunol* 137:3832-3835.
231. Satoh, J., K. Sakai, M. Endoh, F. Koike, T. Kunishita, T. Namikawa, T. Yamamura, and T. Tabira. 1987. Experimental allergic encephalomyelitis mediated by murine encephalitogenic T cell lines specific for myelin proteolipid apoprotein. *J Immunol* 138:179-184.
232. Tuohy, V.K., R.A. Sobel, and M.B. Lees. 1988. Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *J Immunol* 140:1868-1873.
233. Tuohy, V.K., Z.J. Lu, R.A. Sobel, R.A. Laursen, and M.B. Lees. 1988. A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 141:1126-1130.
234. Tuohy, V.K., Z. Lu, R.A. Sobel, R.A. Laursen, and M.B. Lees. 1989. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol* 142:1523-1527.
235. Whitham, R.H., D.N. Bourdette, G.A. Hashim, R.M. Herndon, R.C. Ilg, A.A. Vandenbark, and H. Offner. 1991. Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 146:101-107.
236. Greer, J.M., V.K. Kuchroo, R.A. Sobel, and M.B. Lees. 1992. Identification and characterization of a second encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein (residues 178-191) for SJL mice. *J Immunol* 149:783-788.
237. Johns, T.G., and C.C. Bernard. 1999. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 72:1-9.
238. Kies, M.W., B.F. Driscoll, F.J. Seil, and E.C. Alvord, Jr. 1973. Myelination inhibition factor: dissociation from induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 179:689-690.
239. Seil, F.J., and H.C. Agrawal. 1980. Myelin-proteolipid protein does not induce demyelinating or myelination-inhibiting antibodies. *Brain Res* 194:273-277.
240. Seil, F.J., M.M. Garwood, H.B. Clark, and H.C. Agrawal. 1983. Demyelinating and myelination-inhibiting factors induced by chloroform-methanol insoluble proteins of myelin. *Brain Res* 288:384-388.
241. Seil, F.J., R.H. Quarles, D. Johnson, and R.O. Brady. 1981. Immunization with purified myelin-associated glycoprotein does not evoke myelination-inhibiting or demyelinating antibodies. *Brain Res* 209:470-475.
242. Lebar, R., J.M. Boutry, C. Vincent, R. Robineaux, and G.A. Voisin. 1976. Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor. *J Immunol* 116:1439-1446.
243. Lebar, R., C. Lubetzki, C. Vincent, P. Lombrail, and J.M. Boutry. 1986. The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 66:423-434.
244. Linnington, C., M. Webb, and P.L. Woodhams. 1984. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* 6:387-396.
245. Bernard, C.C., T.G. Johns, A. Slavov, M. Ichikawa, C. Ewing, J. Liu, and J. Bettadapura. 1997. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75:77-88.
246. Amor, S., N. Groome, C. Linnington, M.M. Morris, K. Dornmair, M.V. Gardinier, J.M. Matthieu, and D. Baker. 1994. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* 153:4349-4356.
247. Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun. 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25:1951-1959.

248. Kerlero de Rosbo, N., I. Mendel, and A. Ben-Nun. 1995. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. *Eur J Immunol* 25:985-993.
249. Johns, T.G., N. Kerlero de Rosbo, K.K. Menon, S. Abo, M.F. Gonzales, and C.C. Bernard. 1995. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J Immunol* 154:5536-5541.
250. Ichikawa, M., T.G. Johns, J. Liu, and C.C. Bernard. 1996. Analysis of the fine B cell specificity during the chronic/relapsing course of a multiple sclerosis-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. *J Immunol* 157:919-926.
251. Ichikawa, M., T.G. Johns, M. Adelmann, and C.C. Bernard. 1996. Antibody response in Lewis rats injected with myelin oligodendrocyte glycoprotein derived peptides. *Int Immunol* 8:1667-1674.
252. Adelmann, M., J. Wood, I. Benzel, P. Fiori, H. Lassmann, J.M. Matthieu, M.V. Gardinier, K. Dornmair, and C. Linington. 1995. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63:17-27.
253. Linington, C., T. Berger, L. Perry, S. Weerth, D. Hinze-Selch, Y. Zhang, H.C. Lu, H. Lassmann, and H. Wekerle. 1993. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 23:1364-1372.
254. Storch, M.K., A. Stefferl, U. Brehm, R. Weissert, E. Wallstrom, M. Kerschensteiner, T. Olsson, C. Linington, and H. Lassmann. 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8:681-694.
255. Schluesener, H.J., R.A. Sobel, C. Linington, and H.L. Weiner. 1987. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 139:4016-4021.
256. Linington, C., M. Bradl, H. Lassmann, C. Brunner, and K. Vass. 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130:443-454.
257. Linington, C., B. Engelhardt, G. Kapocs, and H. Lassman. 1992. Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J Neuroimmunol* 40:219-224.
258. Genain, C.P., M.H. Nguyen, N.L. Letvin, R. Pearl, R.L. Davis, M. Adelman, M.B. Lees, C. Linington, and S.L. Hauser. 1995. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 96:2966-2974.
259. Raine, C.S., B. Cannella, S.L. Hauser, and C.P. Genain. 1999. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46:144-160.
260. Genain, C.P., and S.L. Hauser. 1997. Creation of a model for multiple sclerosis in *Callithrix jacchus* marmosets. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 75:187-197.
261. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
262. Kanter, J.L., S. Narayana, P.P. Ho, I. Catz, K.G. Warren, R.A. Sobel, L. Steinman, and W.H. Robinson. 2006. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med* 12:138-143.
263. Villar, L.M., M.C. Sadaba, E. Roldan, J. Masjuan, P. Gonzalez-Porque, N. Villarrubia, M. Espino, J.A. Garcia-Trujillo, A. Bootello, and J.C. Alvarez-Cermeno. 2005. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 115:187-194.
264. Ben-Nun, A., H. Wekerle, and I.R. Cohen. 1981. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11:195-199.
265. Ben-Nun, A., and I.R. Cohen. 1982. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. *J Immunol* 129:303-308.
266. Vandembark, A.A., T. Gill, and H. Offner. 1985. A myelin basic protein-specific T lymphocyte line that mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 135:223-228.
267. Vandembark, A.A., H. Offner, T. Reshef, R. Fritz, C.H. Chou, and I.R. Cohen. 1985. Specificity of T lymphocyte lines for peptides of myelin basic protein. *J Immunol* 135:229-233.

268. Mokhtarian, F., D.E. McFarlin, and C.S. Raine. 1984. Adoptive transfer of myelin basic protein-sensitized T cells produces chronic relapsing demyelinating disease in mice. *Nature* 309:356-358.
269. Raine, C.S., F. Mokhtarian, and D.E. McFarlin. 1984. Adoptively transferred chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Neuropathologic analysis. *Lab Invest* 51:534-546.
270. Zamvil, S.S., and L. Steinman. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8:579-621.
271. Zamvil, S., P. Nelson, J. Trotter, D. Mitchell, R. Knobler, R. Fritz, and L. Steinman. 1985. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317:355-358.
272. Zamvil, S.S., P.A. Nelson, D.J. Mitchell, R.L. Knobler, R.B. Fritz, and L. Steinman. 1985. Encephalitogenic T cell clones specific for myelin basic protein. An unusual bias in antigen recognition. *J Exp Med* 162:2107-2124.
273. Trotter, J., S. Sriram, L. Rassenti, C.H. Chou, R.B. Fritz, and L. Steinman. 1985. Characterization of T cell lines and clones from SJL/J and (BALB/c x SJL/J)F1 mice specific for myelin basic protein. *J Immunol* 134:2322-2327.
274. Zamvil, S.S., D.J. Mitchell, N.E. Lee, A.C. Moore, M.K. Waldor, K. Sakai, J.B. Rothbard, H.O. McDevitt, L. Steinman, and H. Acha-Orbea. 1988. Predominant expression of a T cell receptor V beta gene subfamily in autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 167:1586-1596.
275. Acha-Orbea, H., D.J. Mitchell, L. Timmermann, D.C. Wraith, G.S. Tausch, M.K. Waldor, S.S. Zamvil, H.O. McDevitt, and L. Steinman. 1988. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 54:263-273.
276. Urban, J.L., V. Kumar, D.H. Kono, C. Gomez, S.J. Horvath, J. Clayton, D.G. Ando, E.E. Sercarz, and L. Hood. 1988. Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. *Cell* 54:577-592.
277. Kuchroo, V.K., R.A. Sobel, J.C. Laning, C.A. Martin, E. Greenfield, M.E. Dorf, and M.B. Lees. 1992. Experimental allergic encephalomyelitis mediated by cloned T cells specific for a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. Fine specificity and T cell receptor V beta usage. *J Immunol* 148:3776-3782.
278. Kuchroo, V.K., M. Collins, A. al-Sabbagh, R.A. Sobel, M.J. Whitters, S.S. Zamvil, M.E. Dorf, D.A. Hafler, J.G. Seidman, H.L. Weiner, and et al. 1994. T cell receptor (TCR) usage determines disease susceptibility in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies with TCR V beta 8.2 transgenic mice. *J Exp Med* 179:1659-1664.
279. Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun. 1996. Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta a H-2b mice. *Eur J Immunol* 26:2470-2479.
280. Burns, F.R., X.B. Li, N. Shen, H. Offner, Y.K. Chou, A.A. Vandenbark, and E. Heber-Katz. 1989. Both rat and mouse T cell receptors specific for the encephalitogenic determinant of myelin basic protein use similar V alpha and V beta chain genes even though the major histocompatibility complex and encephalitogenic determinants being recognized are different. *J Exp Med* 169:27-39.
281. Offner, H., G.A. Hashim, B. Celnik, A. Galang, X.B. Li, F.R. Burns, N. Shen, E. Heber-Katz, and A.A. Vandenbark. 1989. T cell determinants of myelin basic protein include a unique encephalitogenic I-E-restricted epitope for Lewis rats. *J Exp Med* 170:355-367.
282. Offner, H., M. Vainiene, D.P. Gold, B. Celnik, R. Wang, G.A. Hashim, and A.A. Vandenbark. 1992. Characterization of the immune response to a secondary encephalitogenic epitope of basic protein in Lewis rats. I. T cell receptor peptide regulation of T cell clones expressing cross-reactive V beta genes. *J Immunol* 148:1706-1711.
283. Gold, D.P., M. Vainiene, B. Celnik, S. Wiley, C. Gibbs, G.A. Hashim, A.A. Vandenbark, and H. Offner. 1992. Characterization of the immune response to a secondary encephalitogenic epitope of basic protein in Lewis rats. II. Biased T cell receptor V beta expression predominates in spinal cord infiltrating T cells. *J Immunol* 148:1712-1717.
284. Heber-Katz, E., and H. Acha-Orbea. 1989. The V-region disease hypothesis: evidence from autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Today* 10:164-169.
285. Goverman, J., A. Woods, L. Larson, L.P. Weiner, L. Hood, and D.M. Zaller. 1993. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 72:551-560.
286. Lafaille, J.J., K. Nagashima, M. Katsuki, and S. Tonegawa. 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78:399-408.

287. Jiang, H., and L. Chess. 2006. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 354:1166-1176.
288. Waldner, H., M.J. Whitters, R.A. Sobel, M. Collins, and V.K. Kuchroo. 2000. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3412-3417.
289. Bettelli, E., M. Pagany, H.L. Weiner, C. Linington, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197:1073-1081.
290. Minohara, M., H. Ochi, S. Matsushita, A. Irie, Y. Nishimura, and J. Kira. 2001. Differences between T-cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. *Tissue Antigens* 57:447-456.
291. Krishnamoorthy, G., H. Lassmann, H. Wekerle, and A. Holz. 2006. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *The Journal of clinical investigation* 116:2385-2392.
292. Bettelli, E., D. Baeten, A. Jager, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo. 2006. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *The Journal of clinical investigation* 116:2393-2402.
293. Sheremata, W., J.B. Cosgrove, and E.H. Eylar. 1974. Cellular hypersensitivity to basic myelin (A1) protein and clinical multiple sclerosis. *N Engl J Med* 291:14-17.
294. Knight, S.C. 1977. Cellular immunity in multiple sclerosis. *Br Med Bull* 33:45-50.
295. Lisak, R.P., and B. Zweiman. 1977. In vitro cell-mediated immunity of cerebrospinal-fluid lymphocytes to myelin basic protein in primary demyelinating diseases. *N Engl J Med* 297:850-853.
296. Richert, J.R., D.E. McFarlin, J.W. Rose, H.F. McFarland, and J.I. Greenstein. 1983. Expansion of antigen-specific T cells from cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 5:317-324.
297. Lisak, R.P., B. Zweiman, J.B. Burns, A. Rostami, and D.H. Silberberg. 1984. Immune responses to myelin antigens in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 436:221-230.
298. Johnson, D., D.A. Hafler, R.J. Fallis, M.B. Lees, R.O. Brady, R.H. Quarles, and H.L. Weiner. 1986. Cell-mediated immunity to myelin-associated glycoprotein, proteolipid protein, and myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 13:99-108.
299. Olsson, T., W.W. Zhi, B. Hojberg, V. Kostulas, Y.P. Jiang, G. Anderson, H.P. Ekre, and H. Link. 1990. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* 86:981-985.
300. Hafler, D.A., D.S. Benjamin, J. Burks, and H.L. Weiner. 1987. Myelin basic protein and proteolipid protein reactivity of brain- and cerebrospinal fluid-derived T cell clones in multiple sclerosis and postinfectious encephalomyelitis. *J Immunol* 139:68-72.
301. Richert, J.R., E.D. Robinson, G.E. Deibler, R.E. Martenson, L.J. Dragovic, and M.W. Kies. 1989. Evidence for multiple human T cell recognition sites on myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 23:55-66.
302. Baxevanis, C.N., G.J. Reclos, C. Servis, E. Anastasopoulos, P. Arsenis, A. Katsiyiannis, N. Matikas, J.D. Lambiris, and M. Papamichail. 1989. Peptides of myelin basic protein stimulate T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 22:23-30.
303. Ota, K., M. Matsui, E.L. Milford, G.A. Mackin, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 1990. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183-187.
304. Martin, R., D. Jaraquemada, M. Flerlage, J. Richert, J. Whitaker, E.O. Long, D.E. McFarlin, and H.F. McFarland. 1990. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 145:540-548.
305. Pette, M., K. Fujita, D. Wilkinson, D.M. Altmann, J. Trowsdale, G. Giegerich, A. Hinkkanen, J.T. Epplen, L. Kappos, and H. Wekerle. 1990. Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7968-7972.
306. Krogsgaard, M., K.W. Wucherpfennig, B. Cannella, B.E. Hansen, A. Svejgaard, J. Pyrdol, H. Ditzel, C. Raine, J. Engberg, and L. Fugger. 2000. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* 191:1395-1412.
307. Kil, K., Y.C. Zang, D. Yang, J. Markowski, G.S. Fuoco, G.C. Vendetti, V.M. Rivera, and J.Z. Zhang. 1999. T cell responses to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 98:201-207.
308. Hohlfeld, R. 1997. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120 (Pt 5):865-916.

309. Sun, J., H. Link, T. Olsson, B.G. Xiao, G. Andersson, H.P. Ekre, C. Linington, and P. Diener. 1991. T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Immunol* 146:1490-1495.
310. Sun, J.B., T. Olsson, W.Z. Wang, B.G. Xiao, V. Kostulas, S. Fredrikson, H.P. Ekre, and H. Link. 1991. Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol* 21:1461-1468.
311. Chou, Y.K., D.N. Bourdette, H. Offner, R. Whitham, R.Y. Wang, G.A. Hashim, and A.A. Vandenbark. 1992. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 38:105-113.
312. Zhang, Y., D. Burger, G. Saruhan, M. Jeannet, and A.J. Steck. 1993. The T-lymphocyte response against myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 43:403-407.
313. Zhang, J., S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179:973-984.
314. Diaz-Villoslada, P., A. Shih, L. Shao, C.P. Genain, and S.L. Hauser. 1999. Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen. *J Neuroimmunol* 99:36-43.
315. Kerlero de Rosbo, N., R. Milo, M.B. Lees, D. Burger, C.C. Bernard, and A. Ben-Nun. 1993. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest* 92:2602-2608.
316. Kerlero de Rosbo, N., M. Hoffman, I. Mendel, I. Yust, J. Kaye, R. Bakimer, S. Flechter, O. Abramsky, R. Milo, A. Karni, and A. Ben-Nun. 1997. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol* 27:3059-3069.
317. Pelfrey, C.M., J.L. Trotter, L.R. Tranquill, and H.F. McFarland. 1994. Identification of a second T cell epitope of human proteolipid protein (residues 89-106) recognized by proliferative and cytolytic CD4+ T cells from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 53:153-161.
318. Trotter, J.L., W.F. Hickey, R.C. van der Veen, and L. Sulze. 1991. Peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein and selected peptides. *J Neuroimmunol* 33:55-62.
319. Pelfrey, C.M., R.A. Rudick, A.C. Coteleur, J.C. Lee, M. Tary-Lehmann, and P.V. Lehmann. 2000. Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokine production. *J Immunol* 165:1641-1651.
320. Hellings, N., M. Baree, C. Verhoeven, B. D'Hooghe M, R. Medaer, C.C. Bernard, J. Raus, and P. Stinissen. 2001. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res* 63:290-302.
321. Hellings, N., J. Raus, and P. Stinissen. 2002. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res* 25:27-51.
322. Mazza, G., M. Ponsford, P. Lowrey, M.J. Campbell, J. Zajicek, and D.C. Wraith. 2002. Diversity and dynamics of the T-cell response to MBP in DR2+ve individuals. *Clin Exp Immunol* 128:538-547.
323. Hemmer, B., M. Vergelli, L. Tranquill, P. Conlon, N. Ling, H.F. McFarland, and R. Martin. 1997. Human T-cell response to myelin basic protein peptide (83-99): extensive heterogeneity in antigen recognition, function, and phenotype. *Neurology* 49:1116-1126.
324. Van der Aa, A., N. Hellings, C.C. Bernard, J. Raus, and P. Stinissen. 2003. Functional properties of myelin oligodendrocyte glycoprotein-reactive T cells in multiple sclerosis patients and controls. *J Neuroimmunol* 137:164-176.
325. Moldovan, I.R., R.A. Rudick, A.C. Coteleur, S.E. Born, J.C. Lee, M.T. Karafa, and C.M. Pelfrey. 2003. Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J Neuroimmunol* 141:132-140.
326. Tejada-Simon, M.V., J. Hong, V.M. Rivera, and J.Z. Zhang. 2001. Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 31:907-917.
327. Madsen, L.S., E.C. Andersson, L. Jansson, M. krogsgaard, C.B. Andersen, J. Engberg, J.L. Strominger, A. Svejgaard, J.P. Hjorth, R. Holmdahl, K.W. Wucherpfennig, and L. Fugger. 1999. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* 23:343-347.
328. Quandt, J.A., M. Baig, K. Yao, K. Kawamura, J. Huh, S.K. Ludwin, H.J. Bian, M. Bryant, L. Quigley, Z.A. Nagy, H.F. McFarland, P.A. Muraro, R. Martin, and K. Ito. 2004. Unique

- clinical and pathological features in HLA-DRB1*0401-restricted MBP 111-129-specific humanized TCR transgenic mice. *J Exp Med* 200:223-234.
329. Wucherpfennig, K.W., K. Ota, N. Endo, J.G. Seidman, A. Rosenzweig, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 1990. Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* 248:1016-1019.
330. Oksenberg, J.R., S. Stuart, A.B. Begovich, R.B. Bell, H.A. Erlich, L. Steinman, and C.C. Bernard. 1990. Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature* 345:344-346.
331. Kotzin, B.L., S. Karuturi, Y.K. Chou, J. Lafferty, J.M. Forrester, M. Better, G.E. Nedwin, H. Offner, and A.A. Vandenbark. 1991. Preferential T-cell receptor beta-chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9161-9165.
332. Oksenberg, J.R., M.A. Panzara, A.B. Begovich, D. Mitchell, H.A. Erlich, R.S. Murray, R. Shimonkevitz, M. Sherritt, J. Rothbard, C.C. Bernard, and et al. 1993. Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362:68-70.
333. Zang, Y.C., M. Kozovska, I. Aebischer, S. Li, S. Boehme, P. Crowe, V.M. Rivera, and J.Z. Zhang. 1998. Restricted TCR Valpha gene rearrangements in T cells recognizing an immunodominant peptide of myelin basic protein in DR2 patients with multiple sclerosis. *Int Immunol* 10:991-998.
334. Muraro, P.A., L. Bonanni, B. Mazzanti, A. Pantalone, E. Traggiai, L. Massacesi, M. Vergelli, and D. Gambi. 2002. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J Neuroimmunol* 127:149-159.
335. Wucherpfennig, K.W., J. Zhang, C. Witek, M. Matsui, Y. Modabber, K. Ota, and D.A. Hafler. 1994. Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *J Immunol* 152:5581-5592.
336. Muraro, P.A., M. Vergelli, M. Kalbus, D.E. Banks, J.W. Nagle, L.R. Tranquill, G.T. Nepom, W.E. Biddison, H.F. McFarland, and R. Martin. 1997. Immunodominance of a low-affinity major histocompatibility complex-binding myelin basic protein epitope (residues 111-129) in HLA-DR4 (B1*0401) subjects is associated with a restricted T cell receptor repertoire. *J Clin Invest* 100:339-349.
337. Offner, H., and A.A. Vandenbark. 1999. T cell receptor V genes in multiple sclerosis: increased use of TCRAV8 and TCRBV5 in MBP-specific clones. *Int Rev Immunol* 18:9-36.
338. Ben-Nun, A., R.S. Liblau, L. Cohen, D. Lehmann, E. Tournier-Lasserre, A. Rosenzweig, J.W. Zhang, J.C. Raus, and M.A. Bach. 1991. Restricted T-cell receptor V beta gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: predominant genes vary in individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2466-2470.
339. Meinl, E., F. Weber, K. Drexler, C. Morelle, M. Ott, G. Saruhan-Direskeneli, N. Goebels, B. Ertl, G. Jechart, G. Giegerich, and et al. 1993. Myelin basic protein-specific T lymphocyte repertoire in multiple sclerosis. Complexity of the response and dominance of nested epitopes due to recruitment of multiple T cell clones. *J Clin Invest* 92:2633-2643.
340. Giegerich, G., M. Pette, E. Meinl, J.T. Epplen, H. Wekerle, and A. Hinkkanen. 1992. Diversity of T cell receptor alpha and beta chain genes expressed by human T cells specific for similar myelin basic protein peptide/major histocompatibility complexes. *Eur J Immunol* 22:753-758.
341. Martin, R., U. Utz, J.E. Coligan, J.R. Richert, M. Flerlage, E. Robinson, R. Stone, W.E. Biddison, D.E. McFarlin, and H.F. McFarland. 1992. Diversity in fine specificity and T cell receptor usage of the human CD4+ cytotoxic T cell response specific for the immunodominant myelin basic protein peptide 87-106. *J Immunol* 148:1359-1366.
342. Wucherpfennig, K.W., J. Newcombe, H. Li, C. Keddy, M.L. Cuzner, and D.A. Hafler. 1992. T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 175:993-1002.
343. Wucherpfennig, K.W., and D.A. Hafler. 1995. A review of T-cell receptors in multiple sclerosis: clonal expansion and persistence of human T-cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *Ann N Y Acad Sci* 756:241-258.
344. Allegretta, M., and L. Steinman. 1995. Unique T-cell receptor junctional sequences found in multiple sclerosis and T-cells mediating experimental allergic encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 756:265-282.
345. Wucherpfennig, K.W., H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 1991. T-cell recognition of myelin basic protein. *Immunol Today* 12:277-282.
346. Brocke, S., A. Gaur, C. Piercy, A. Gautam, K. Gijbels, C.G. Fathman, and L. Steinman. 1993. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 365:642-644.

347. Brocke, S., C. Piercy, and L. Steinman. 1996. Superantigens in demyelinating disease. *Springer Semin Immunopathol* 18:51-56.
348. Soos, J.M., J. Schiffenbauer, and H.M. Johnson. 1993. Treatment of PL/J mice with the superantigen, staphylococcal enterotoxin B, prevents development of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 43:39-43.
349. Soos, J.M., A.C. Hobeika, E.J. Butfiloski, J. Schiffenbauer, and H.M. Johnson. 1995. Accelerated induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J mice by a non-V beta 8-specific superantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6082-6086.
350. Schiffenbauer, J., H.M. Johnson, E.J. Butfiloski, L. Wegrzyn, and J.M. Soos. 1993. Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8543-8546.
351. Kumar, V., and E.E. Sercarz. 1993. The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med* 178:909-916.
352. Vandenbark, A.A., G.A. Hashim, and H. Offner. 1996. T cell receptor peptides in treatment of autoimmune disease: rationale and potential. *J Neurosci Res* 43:391-402.
353. Peterson, D.A., R.J. DiPaolo, O. Kanagawa, and E.R. Unanue. 1999. Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11:453-462.
354. Harrington, C.J., A. Paez, T. Hunkapiller, V. Mannikko, T. Brabb, M. Ahearn, C. Beeson, and J. Gorman. 1998. Differential tolerance is induced in T cells recognizing distinct epitopes of myelin basic protein. *Immunity* 8:571-580.
355. Targoni, O.S., and P.V. Lehmann. 1998. Endogenous myelin basic protein inactivates the high avidity T cell repertoire. *J Exp Med* 187:2055-2063.
356. Ridgway, W.M., M. Fasso, and C.G. Fathman. 1999. A new look at MHC and autoimmune disease. *Science* 284:749, 751.
357. DiPaolo, R.J., and E.R. Unanue. 2002. Cutting edge: chemical dominance does not relate to immunodominance: studies of the CD4+ T cell response to a model antigen. *J Immunol* 169:1-4.
358. Bielekova, B., M.H. Sung, N. Kadom, R. Simon, H. McFarland, and R. Martin. 2004. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172:3893-3904.
359. Gilden, D.H., M.P. Burgoon, B.K. Kleinschmidt-DeMasters, R.A. Williamson, O. Ghausi, D.R. Burton, and G.P. Owens. 2001. Molecular immunologic strategies to identify antigens and b-cell responses unique to multiple sclerosis. *Arch Neurol* 58:43-48.
360. Bischof, F., M. Hofmann, T.N. Schumacher, F.A. Vyth-Dreese, R. Weissert, H. Schild, A.M. Kruisbeek, and A. Melms. 2004. Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary and secondary challenge using MHC class II tetramers. *J Immunol* 172:2878-2884.
361. Targoni, O.S., J. Baus, H.H. Hofstetter, M.D. Hesse, A.Y. Karulin, B.O. Boehm, T.G. Forsthuber, and P.V. Lehmann. 2001. Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 166:4757-4764.
362. Reddy, J., E. Bettelli, L. Nicholson, H. Waldner, M.H. Jang, K.W. Wucherpfennig, and V.K. Kuchroo. 2003. Detection of autoreactive myelin proteolipid protein 139-151-specific T cells by using MHC II (IAs) tetramers. *J Immunol* 170:870-877.
363. Pelfrey, C.M., and I.R. Moldovan. 2005. Epitope mapping in multiple sclerosis using the ELISPOT assay. *Methods Mol Biol* 302:219-236.
364. Sospedra, M., C. Pinilla, and R. Martin. 2003. Use of combinatorial peptide libraries for T-cell epitope mapping. *Methods* 29:236-247.
365. Hemmer, B., B.T. Fleckenstein, M. Vergelli, G. Jung, H. McFarland, R. Martin, and K.H. Wiesmuller. 1997. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 185:1651-1659.
366. Kersh, G.J., and P.M. Allen. 1996. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* 380:495-498.
367. Cohen, I.R., U. Hersherberg, and S. Solomon. 2004. Antigen-receptor degeneracy and immunological paradigms. *Mol Immunol* 40:993-996.
368. Wucherpfennig, K.W. 2004. T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition. *Mol Immunol* 40:1009-1017.
369. Sospedra, M., and R. Martin. 2006. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 39:3-8.
370. Wekerle, H., and R. Hohlfeld. 2003. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 349:185-186.

371. Kersh, G.J., and P.M. Allen. 1996. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *J Exp Med* 184:1259-1268.
372. Oldstone, M.B. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50:819-820.
373. Oldstone, M.B. 2005. Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Curr Top Microbiol Immunol* 296:1-17.
374. Martin, R., B. Gran, Y. Zhao, S. Markovic-Plese, B. Bielekova, A. Marques, M.H. Sung, B. Hemmer, R. Simon, H.F. McFarland, and C. Pinilla. 2001. Molecular mimicry and antigen-specific T cell responses in multiple sclerosis and chronic CNS Lyme disease. *J Autoimmun* 16:187-192.
375. Levin, M.C., S.M. Lee, F. Kalume, Y. Morcos, F.C. Dohan, Jr., K.A. Hasty, J.C. Callaway, J. Zunt, D. Desiderio, and J.M. Stuart. 2002. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med* 8:509-513.
376. Fujinami, R.S., and M.B. Oldstone. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230:1043-1045.
377. Wucherpfennig, K.W., and J.L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705.
378. Hemmer, B., M. Vergelli, B. Gran, N. Ling, P. Conlon, C. Pinilla, R. Houghten, H.F. McFarland, and R. Martin. 1998. Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology. *J Immunol* 160:3631-3636.
379. Lang, H.L., H. Jacobsen, S. Ikemizu, C. Andersson, K. Harlos, L. Madsen, P. Hjorth, L. Sondergaard, A. Svejgaard, K. Wucherpfennig, D.I. Stuart, J.I. Bell, E.Y. Jones, and L. Fugger. 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 3:940-943.
380. Krogsgaard, M., and M.M. Davis. 2005. How T cells 'see' antigen. *Nat Immunol* 6:239-245.
381. Evavold, B.D., J. Sloan-Lancaster, K.J. Wilson, J.B. Rothbard, and P.M. Allen. 1995. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* 2:655-663.
382. Smith, K.J., J. Pyrdol, L. Gauthier, D.C. Wiley, and K.W. Wucherpfennig. 1998. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med* 188:1511-1520.
383. Wucherpfennig, K.W., A. Sette, S. Southwood, C. Oseroff, M. Matsui, J.L. Strominger, and D.A. Hafler. 1994. Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J Exp Med* 179:279-290.
384. Hemmer, B., T. Kondo, B. Gran, C. Pinilla, I. Cortese, J. Pascal, A. Tzou, H.F. McFarland, R. Houghten, and R. Martin. 2000. Minimal peptide length requirements for CD4(+) T cell clones--implications for molecular mimicry and T cell survival. *Int Immunol* 12:375-383.
385. Wucherpfennig, K.W., D.A. Hafler, and J.L. Strominger. 1995. Structure of human T-cell receptors specific for an immunodominant myelin basic protein peptide: positioning of T-cell receptors on HLA-DR2/peptide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8896-8900.
386. Hahn, M., M.J. Nicholson, J. Pyrdol, and K.W. Wucherpfennig. 2005. Unconventional topology of self peptide-major histocompatibility complex binding by a human autoimmune T cell receptor. *Nat Immunol* 6:490-496.
387. Li, Y., Y. Huang, J. Lue, J.A. Quandt, R. Martin, and R.A. Mariuzza. 2005. Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule. *Embo J* 24:2968-2979.
388. Nicholson, M.J., M. Hahn, and K.W. Wucherpfennig. 2005. Unusual features of self-peptide/MHC binding by autoimmune T cell receptors. *Immunity* 23:351-360.
389. Sone, T., K. Tsukamoto, K. Hirayama, Y. Nishimura, T. Takenouchi, M. Aizawa, and T. Sasazuki. 1985. Two distinct class II molecules encoded by the genes within HLA-DR subregion of HLA-Dw2 and Dw12 can act as stimulating and restriction molecules. *J Immunol* 135:1288-1298.
390. Gauthier, L., K.J. Smith, J. Pyrdol, A. Kalandadze, J.L. Strominger, D.C. Wiley, and K.W. Wucherpfennig. 1998. Expression and crystallization of the complex of HLA-DR2 (DRA, DRB1*1501) and an immunodominant peptide of human myelin basic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11828-11833.
391. Li, Y., H. Li, R. Martin, and R.A. Mariuzza. 2000. Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins. *J Mol Biol* 304:177-188.

392. Fairchild, P.J., R. Wildgoose, E. Atherton, S. Webb, and D.C. Wraith. 1993. An autoantigenic T cell epitope forms unstable complexes with class II MHC: a novel route for escape from tolerance induction. *Int Immunol* 5:1151-1158.
393. Fugger, L., J. Liang, A. Gautam, J.B. Rothbard, and H.O. McDevitt. 1996. Quantitative analysis of peptides from myelin basic protein binding to the MHC class II protein, I-Au, which confers susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Med* 2:181-188.
394. Gautam, A.M., C.B. Lock, D.E. Smilek, C.I. Pearson, L. Steinman, and H.O. McDevitt. 1994. Minimum structural requirements for peptide presentation by major histocompatibility complex class II molecules: implications in induction of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:767-771.
395. Fairchild, P.J., H. Pope, and D.C. Wraith. 1996. The nature of cryptic epitopes within the self-antigen myelin basic protein. *Int Immunol* 8:1035-1043.
396. He, X.L., C. Radu, J. Sidney, A. Sette, E.S. Ward, and K.C. Garcia. 2002. Structural snapshot of aberrant antigen presentation linked to autoimmunity: the immunodominant epitope of MBP complexed with I-Au. *Immunity* 17:83-94.
397. Sercarz, E.E., P.V. Lehmann, A. Ametani, G. Benichou, A. Miller, and K. Moudgil. 1993. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 11:729-766.
398. Hunt, D.F., H. Michel, T.A. Dickinson, J. Shabanowitz, A.L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H.M. Grey, and A. Sette. 1992. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 256:1817-1820.
399. Chicz, R.M., R.G. Urban, J.C. Gorga, D.A. Vignali, W.S. Lane, and J.L. Strominger. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 178:27-47.
400. Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
401. Hammer, J., P. Valsasini, K. Tolba, D. Bolin, J. Higelin, B. Takacs, and F. Sinigaglia. 1993. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 74:197-203.
402. Valli, A., A. Sette, L. Kappos, C. Oseroff, J. Sidney, G. Miescher, M. Hochberger, E.D. Albert, and L. Adorini. 1993. Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 91:616-628.
403. Sospedra, M., P.A. Muraro, I. Stefanova, Y. Zhao, K. Chung, Y. Li, M. Giulianotti, R. Simon, R. Mariuzza, C. Pinilla, and R. Martin. 2006. Redundancy in antigen-presenting function of the HLA-DR and -DQ molecules in the multiple sclerosis-associated HLA-DR2 haplotype. *J Immunol* 176:1951-1961.
404. Perry, L.L., and M.E. Barzaga. 1987. Kinetics and specificity of T and B cell responses in relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 138:1434-1441.
405. McCarron, R.M., R.J. Fallis, and D.E. McFarlin. 1990. Alterations in T cell antigen specificity and class II restriction during the course of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 29:73-79.
406. Cross, A.H., V.K. Tuohy, and C.S. Raine. 1993. Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination. *Cell Immunol* 146:261-269.
407. Lehmann, P.V., T. Forsthuber, A. Miller, and E.E. Sercarz. 1992. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358:155-157.
408. Lehmann, P.V., E.E. Sercarz, T. Forsthuber, C.M. Dayan, and G. Gammon. 1993. Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunol Today* 14:203-208.
409. McRae, B.L., C.L. Vanderlugt, M.C. Dal Canto, and S.D. Miller. 1995. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 182:75-85.
410. Vanderlugt, C.L., K.L. Neville, K.M. Nikcevic, T.N. Eagar, J.A. Bluestone, and S.D. Miller. 2000. Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164:670-678.
411. Miller, S.D., C.L. Vanderlugt, D.J. Lenschow, J.G. Pope, N.J. Karandikar, M.C. Dal Canto, and J.A. Bluestone. 1995. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 3:739-745.
412. Vanderlugt, C.L., W.S. Begolka, K.L. Neville, Y. Katz-Levy, L.M. Howard, T.N. Eagar, J.A. Bluestone, and S.D. Miller. 1998. The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol Rev* 164:63-72.
413. Miller, S.D., Y. Katz-Levy, K.L. Neville, and C.L. Vanderlugt. 2001. Virus-induced autoimmunity: epitope spreading to myelin autoepitopes in Theiler's virus infection of the central nervous system. *Adv Virus Res* 56:199-217.

414. Yu, M., J.M. Johnson, and V.K. Tuohy. 1996. A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* 183:1777-1788.
415. Tuohy, V.K., M. Yu, L. Yin, J.A. Kawczak, and R.P. Kinkel. 1999. Spontaneous regression of primary autoreactivity during chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med* 189:1033-1042.
416. Tuohy, V.K., M. Yu, L. Yin, J.A. Kawczak, and P.R. Kinkel. 1999. Regression and spreading of self-recognition during the development of autoimmune demyelinating disease. *J Autoimmun* 13:11-20.
417. Tuohy, V.K., M. Yu, L. Yin, J.A. Kawczak, J.M. Johnson, P.M. Mathisen, B. Weinstock-Guttman, and R.P. Kinkel. 1998. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 164:93-100.
418. Steinman, L. 1999. Absence of "original antigenic sin" in autoimmunity provides an unforeseen platform for immune therapy. *J Exp Med* 189:1021-1024.
419. Vandalugt, C.L., and S.D. Miller. 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2:85-95.
420. Anderson, A.C., L.B. Nicholson, K.L. Legge, V. Turchin, H. Zaghoulani, and V.K. Kuchroo. 2000. High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med* 191:761-770.
421. Kumar, V. 1998. Determinant spreading during experimental autoimmune encephalomyelitis: is it potentiating, protecting or participating in the disease? *Immunol Rev* 164:73-80.
422. Campagnoni, A.T., T.M. Pribyl, C.W. Campagnoni, K. Kampf, S. Amur-Umarjee, C.F. Landry, V.W. Handley, S.L. Newman, B. Garbay, and K. Kitamura. 1993. Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain. *J Biol Chem* 268:4930-4938.
423. Pribyl, T.M., C.W. Campagnoni, K. Kampf, T. Kashima, V.W. Handley, J. McMahon, and A.T. Campagnoni. 1993. The human myelin basic protein gene is included within a 179-kilobase transcription unit: expression in the immune and central nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10695-10699.
424. MacKenzie-Graham, A.J., T.M. Pribyl, S. Kim, V.R. Porter, A.T. Campagnoni, and R.R. Voskuhl. 1997. Myelin protein expression is increased in lymph nodes of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 159:4602-4610.
425. McMahon, E.J., S.L. Bailey, C.V. Castenada, H. Waldner, and S.D. Miller. 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:335-339.
426. Moudgil, K.D. 1998. Diversification of response to hsp65 during the course of autoimmune arthritis is regulatory rather than pathogenic. *Immunol Rev* 164:175-184.
427. Takacs, K., P. Chandler, and D.M. Altmann. 1997. Relapsing and remitting experimental allergic encephalomyelitis: a focused response to the encephalitogenic peptide rather than epitope spread. *Eur J Immunol* 27:2927-2934.
428. Takacs, K., and D.M. Altmann. 1998. The case against epitope spread in experimental allergic encephalomyelitis. *Immunol Rev* 164:101-110.
429. Voskuhl, R.R., R.W. Farris, 2nd, K. Nagasato, H.F. McFarland, and M.D. Dalcq. 1996. Epitope spreading occurs in active but not passive EAE induced by myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 70:103-111.
430. Jones, R.E., D. Bourdette, N. Moes, A. Vandenbark, A. Zamora, and H. Offner. 2003. Epitope spreading is not required for relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170:1690-1698.
431. Smith, P.A., M. Morris-Downes, N. Heijmans, G. Pryce, E. Arter, J.K. O'Neill, B. t Hart, D. Baker, and S. Amor. 2005. Epitope spread is not critical for the relapse and progression of MOG 8-21 induced EAE in Biozzi ABH mice. *J Neuroimmunol* 164:76-84.
432. Tuohy, V.K., M. Yu, B. Weinstock-Guttman, and R.P. Kinkel. 1997. Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 99:1682-1690.
433. Yu, M., R.P. Kinkel, B. Weinstock-Guttman, D.J. Cook, and V.K. Tuohy. 1998. HLA-DP: a class II restriction molecule involved in epitope spreading during the development of multiple sclerosis. *Hum Immunol* 59:15-24.
434. Klehmet, J., C. Shive, R. Guardia-Wolff, I. Petersen, E.G. Spack, B.O. Boehm, R. Weissert, and T.G. Forsthuber. 2004. T cell epitope spreading to myelin oligodendrocyte glycoprotein in HLA-DR4 transgenic mice during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 111:53-60.

- 435. Goebels, N., H. Hofstetter, S. Schmidt, C. Brunner, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 2000. Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain* 123 Pt 3:508-518.
- 436. Ristori, G., F. Giubilei, D. Giunti, A. Perna, C. Gasperini, C. Buttinelli, M. Salvetti, and A. Uccelli. 2000. Myelin basic protein intramolecular spreading without disease progression in a patient with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 110:240-243.
- 437. Steinman, L. 2000. Despite epitope spreading in the pathogenesis of autoimmune disease, highly restricted approaches to immune therapy may still succeed [with a hedge on this bet]. *J Autoimmun* 14:278-282.

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de Terapêuticas Baseadas em Antigénios para a Prevenção e Tratamento das Doenças Desmielinizantes Primárias.

1. Introdução. Terapêutica da Esclerose Múltipla: terapêutica multidisciplinar, farmacológica e não farmacológica da Esclerose Múltipla, seguimento dos doentes. Estado actual das terapêuticas imunomoduladoras modificadoras da doença, e alvos terapêuticos emergentes. Terapêuticas antígeno-específicas e não antígeno-específicas.

O tratamento da Esclerose Múltipla (EM) é um desafio que tem vindo a frustrar os clínicos há quase tanto tempo quanto a doença é conhecida; praticamente, só na última década passaram a estar vulgarmente disponíveis fármacos com alguma capacidade de modificação do seu curso clínico, e impacto marginal sobre a acumulação de incapacidade neurológica. Durante grande parte do século anterior, era habitual encontrar, na maioria dos neurologistas, uma postura de niilismo terapêutico perante esta patologia, imposta, em grande medida, pela aparente incapacidade de influenciar, de algum modo, a marcha inexorável da deterioração neurológica destes doentes. Várias formas de terapêutica, farmacológica e não farmacológica, foram tentadas com insucesso; em comum, todas estas modalidades compartilhavam conceitos etiopatogénicos pouco sólidos. Como vimos no capítulo precedente, foi, sobretudo, a partir da década de 1960, que a EM começou a ser compreendida com base na analogia com o modelo experimental de Encefalomielite Autoimune (EAE), e que começou a ser construído o modelo-padrão de etiopatogénese que ainda hoje seguimos. No final desta década, surgiram os primeiros estudos sobre uma nova forma de terapia experimental, baseada na composição química do principal antígeno então conhecido, a proteína básica de mielina; este fármaco imunomodulador sofreu, de seguida, um longo período de desenvolvimento sendo, hoje, uma das terapêuticas farmacológicas aprovadas para o tratamento da EM – o acetato de glatiramero. Demorou 28 anos desde o primeiro trabalho experimental sobre este fármaco (1967) até à publicação do ensaio clínico de fase III (1995), que levou à sua aprovação para uso nos doentes com EM. Como adiante veremos, já passados quase 40 anos sobre a

sua descoberta, ainda continuamos, hoje, a esclarecer os seus mecanismos de acção (independentemente da comprovação da sua eficácia). A outra grande forma de terapia modificadora da doença, plenamente difundida, e utilizada na larga maioria dos doentes, consiste na administração parentérica periódica de um interferão de tipo I, o interferão beta produzido por tecnologia de ADN recombinante. Inicialmente testado, no final dos anos 1980, com base nos seus potenciais efeitos antivirais sobre uma putativa infecção subjacente à EM (aliás, tal como os outros dois interferões, alfa e gama), este fármaco sofreu um processo de desenvolvimento mais célere; o estudo pivô inicial surgiu em 1993, seguido da sua rápida aprovação. Uma vez mais, no entanto, os mecanismos de acção deste fármaco são ainda imperfeitamente conhecidos. Ou seja: as duas principais formas de terapêutica imunomoduladora utilizadas no tratamento da Esclerose Múltipla são fruto da serendipidade^f, e não do desenho racional de fármacos. Hoje em dia, o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas continua a dever muito ao acaso e observação fortuita, mas muito mais à tentativa informada de interferência com os processos etiopatogénicos entretanto descobertos nos modelos experimentais e confirmados, quando possível, pelo confronto com a realidade clínica. Apesar disso, são ainda muito mais as tentativas frustradas que as bem sucedidas, sinal da insuficiência dos nossos conhecimentos, e do fosso conceptual que separa a EAE da EM. O desenvolvimento de terapias baseadas em antigénios, ou antigénio-específicas (TAE), tema deste capítulo e do nosso trabalho, é um exemplo concreto deste desenho racional, informado, de fármacos.

O tratamento farmacológico dos doentes com Esclerose Múltipla deve, idealmente, fazer parte de uma abordagem multidisciplinar do seguimento destes doentes, dentro do contexto de uma clínica ou consulta de EM bem organizada. Consultas deste tipo facultam um conjunto de cuidados de

^f Serendipidade: descobrir por acaso, fortuitamente. A palavra, de origem inglesa (*serendipity*), foi cunhada em 1754 por Sir Horace Walpole, depois de ter lido um conto de origem persa: "I once read a silly fairy tale, called *The Three Princes of Serendip*: as their highnesses travelled, they were always making discoveries, by accidents and sagacity, of things which they were not in quest of" (Serendip ou Serendib era o nome árabe de Ceilão, ou Sri Lanka).

saúde ministrados por vários profissionais, de forma a responder às necessidades sentidas pelos doentes nas várias fases de evolução da sua doença (1). Estes cuidados incluem, mas não se limitam, a monitorização clínica, imagiológica e laboratorial dos doentes, escolha e administração de terapias imunomoduladoras, terapia sintomática farmacológica e não-farmacológica, tratamento dos surtos, apoio fisiátrico, fisioterapia e treino de actividades de vida diárias, apoio psicológico, sociológico e profissional ao doente e seus familiares (1). Dentro da terapia farmacológica, podem ser distinguidas duas grandes categorias: a sintomática e a modificadora da doença. Enquanto a primeira se destina a combater e aliviar as múltiplas queixas resultantes da acumulação de défices neurológicos ao longo do curso da doença (e.g. queixas urinárias e sexuais, espasticidade, alterações do humor e cognição, fadiga) (2, 3), com a segunda pretende-se alterar o processo fisiopatológico subjacente à doença (4).

O modelo-padrão da fisiopatologia, que explanámos nos dois capítulos anteriores, baseia-se no conceito da EM como doença imuno-mediada, de cariz autoimune, centrada no ataque à mielina do SNC. Não se conhecendo a etiologia da Esclerose Múltipla, não é possível falar em profilaxia nem em terapêutica etiológica; todas as terapêuticas modificadoras de doença (TMD) actualmente empregues, ou candidatas futuras, baseiam-se neste modelo para explicar a sua forma de acção, ou evoluíram directamente dele – significando uma evolução no paradigma terapêutico da serendipidade para o desenho racional. O *standard of care* actual para os doentes com EM, no que respeita a TMD, inclui, na esmagadora maioria dos casos, o tratamento com uma das formas de imunomodulação ou imunossupressão de uso corrente: interferão beta (IFN β), acetato de glatiramero (AG), imunoglobulinas endovenosas (IGEV), ou azatioprina, mitoxantrona, metotrexato e ciclofosfamida, respectivamente (5-14). Combinações destes fármacos, e outros tipos de imunoterapia alternativa são também, por vezes, utilizados, como terapêutica de segunda ou terceira linha, ou dentro do contexto de ensaios clínicos (7, 8, 11). Não é pretensão deste trabalho rever a vastíssima literatura que dá suporte à utilização de cada um destes

fármacos, nem os múltiplos ensaios clínicos em que foram utilizados, pelo que remetemos o leitor para a literatura publicada e as obras de referência.

Basta mencionar que é, hoje em dia, praticamente incontornável o uso de alguma destas formas de terapia, sobretudo para os doentes que se apresentam com formas de surto-remissão. Com base em numerosos ensaios clínicos realizados ao longo da última década, o papel de cada um destes agentes modificadores de doença tem vindo a ser delineado, e, mais ainda, o nosso conhecimento sobre a doença cresceu significativamente, proporcionalmente muito mais do que no restante da sua história. Quer isto dizer que, simplisticamente, para as formas primariamente progressivas, com ou sem surtos, nenhuma terapêutica se provou eficaz; para as formas surto-remissão, a primeira linha terapêutica é, na maioria dos casos, a interferão beta (nas suas diversas variantes de via de administração, e dosagem) ou, em casos seleccionados, o acetato de glatiramero; as formas secundariamente progressivas parecem responder, pelo menos numa fase inicial em que ainda ocorrem surtos, a dosagens elevadas de interferão beta (11). As TMD de primeira linha parecem reduzir o número de surtos clínicos em cerca de um terço, têm um efeito robusto sobre a redução de actividade da doença medida por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do neuro-eixo, e têm um efeito marginal sobre a progressão da incapacidade. Mais recentemente, o tratamento precoce com interferão beta, após surto clínico isolado (SCI), revelou-se útil na prevenção da conversão a formas clinicamente definitivas da doença, e no atraso da acumulação da incapacidade (11). As restantes doenças do espectro desmielinizante (brevemente descritas no capítulo anterior), até pela sua raridade, têm sido alvo de menor atenção, e a sua terapêutica é baseada, na maioria dos casos, na experiência obtida em pequenas séries de doentes. Nas formas clinicamente mais agressivas são, habitualmente, usados imunossupressores, formas alternativas de imunomodulação (como a plasmaférese, ou a IGEV), e mesmo a imunoablação através de transplante autólogo de células estaminais hematopoiéticas após quimioterapia de alta

dosagem; infelizmente, na maioria dos casos existe, ainda, pouca experiência no uso destas terapêuticas (15-17) .

No que respeita às TMD, parece termos atingido um patamar relativamente consensual: pela primeira vez na história da EM, ao diagnóstico da doença segue-se uma proposta terapêutica confiante; mais, procura-se, activamente, o diagnóstico de forma precoce, de forma a estabelecer essa terapêutica. Tomando apenas o exemplo da TMD mais comumente utilizada – o interferão beta – estaremos praticamente a atingir o horizonte limite do conhecimento da sua utilidade (18). Ou seja, sabemos o que é expectável com o seu uso: eficácia na conversão de SCI a EM, eficácia parcial nas fases iniciais da EM com surtos e remissão, decrescimento progressivo desta eficácia à medida que os doentes evoluem para formas secundariamente progressivas, ausência total de eficácia nas formas progressivas sem surtos (primárias ou não). O efeito clínico deste fármaco é variável entre doentes, sendo possível falar em “respondedores” e “não-respondedores”, ou “respondedores-parciais”; não existe, neste momento, forma de distinguir entre estas categorias na altura de escolha da terapêutica. Parece existir algum efeito dose-resposta, em que formulações com dosagens mais elevadas têm maior eficácia no controle da doença. Existem, naturalmente, ainda múltiplas perguntas por responder sobre este fármaco: por exemplo, qual a forma de administração (via, dosagem) mais eficaz para cada doente, quando se deve iniciar a terapia e qual é a duração ideal de tratamento, como se deve fazer a monitorização da eficácia da terapêutica (clínica, laboratorial, RMN); qual o perfil de resposta genómica a esta terapia, em que medida o aparecimento de anticorpos neutralizantes deve ser encarado como *trade-off* na escolha da dosagem de IFN; como deve ser promovida a aderência à medicação, como prevenir e controlar os efeitos adversos; em que situações usar esta terapêutica isolada, ou em combinação com outros agentes imunomoduladores (11, 18-20). Embora importante, nenhuma destas questões é conceptualmente relevante; trata-se de maximizar a eficácia de um fármaco cujas limitações foram já descobertas, de maneira a potenciar o seu efeito terapêutico – e o mesmo se poderá dizer

em relação às restantes alternativas terapêuticas (14). A resposta a qualquer destas questões, tendo efeito prático no seguimento dos doentes, não nos irá fazer avançar para além destes limites; para tal, serão necessárias novas abordagens terapêuticas (21).

Idealmente, a terapia deveria ser capaz de parar por completo o processo fisiopatológico, de forma consistente, impedir totalmente o acumular de incapacidade, e ter capacidade regenerativa sobre as lesões já existentes. Como vimos, nenhuma das alternativas de que dispomos actualmente, chega perto de atingir estas metas desejáveis, pelo que existe, claramente, grande necessidade de desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. No que respeita ao aspecto imunoterapêutico, ao longo das duas últimas décadas, para além do INF β e do AG, somente um novo fármaco conseguiu demonstrar eficácia clínica e ser aprovado para uso nesta doença, após um longo período de desenvolvimento pré-clínico e clínico: o anticorpo monoclonal anti-integrina α 4 natalizumab (22, 23). Apesar da sua eficácia inquestionável, o aparecimento de efeitos adversos graves imprevistos (desenvolvimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva) levou a alguma incerteza sobre qual será o papel futuro deste fármaco no tratamento da EM (24-26). Muitas outras terapêuticas foram, entretanto, abandonadas, após ensaios clínicos falhados ou interrompidos: modificadores do padrão de citocinas (antagonistas do TNF, IL-10, IL-4), imunossuppressores gerais (linomido, sulfasalazina, deoxiespergualina, cladribina), ou específicos (anticorpos anti-CD3 e anti-CD4) promotores da remielinização (IVIG), entre outras classes terapêuticas (revisto em (27, 28)). Vários outros agentes terapêuticos encontram-se em diferentes fases de ensaio clínico, isoladamente ou em combinação, incluindo, entre outros, vários anticorpos monoclonais (daclizumab, rituximab, alentuzumab), vacinação com células T e receptores da célula T (NeuroVax, ATM027, IR-208), imunomoduladores e imunossuppressores orais (cladribina, fingolimod, micofenolato mofetil), estatinas (simvastatina, lovastatina), estrogénios, bloqueadores de receptores de quimiocinas e das metaloproteinases de matriz, citocinas e moléculas co-estimuladoras, neuroprotectores (riluzole),

antagonistas dos receptores nucleares PPAR (pioglitazone, rosiglitazone) (revisto em (29-31)). Em relação à vertente regenerativa, apesar de vários avanços promissores na compreensão da génese da placa desmielinizante, e dos mecanismos envolvidos na remielinização e regeneração axonal (revisto em (32)), não temos, ainda, em uso clínico, nenhuma terapêutica eficaz. Possivelmente, o uso de células estaminais com capacidade de diferenciação neuronal e oligodendrocitária, aliado ao bloqueio de mecanismos intrínsecos que impedem activamente a remielinização (como a via *Notch-Jagged*) ou a regeneração (como as proteínas inibidoras do recrescimento axonal MAG, OMgp e Nogo-A), poderá ser eficaz na resolução deste problema (32). De qualquer forma, o cenário mais provável para a EM é o de uma terapêutica multimodal, com vários fármacos a serem empregues em diferentes fases da doença, e com diferentes objectivos, sejam eles o controle do processo imunopatológico, ou a recuperação das lesões existentes.

A imunoterapia da Esclerose Múltipla sofreu uma grande evolução nas últimas duas décadas, em virtude dos sucessos, mais ou menos fortuitos, do IFN β e AG, mas também em grande medida pelos numerosos fracassos. De qualquer forma, houve uma mudança de paradigma no que respeita à eficácia da terapêutica; a EM passou a considerar-se uma doença tratável por imunoterapia, e susceptível de modificação do seu curso. Esta primeira fase da era terapêutica será sucedida por uma nova época, caracterizada pelo desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas baseadas numa melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos, e nos modelos animais da doença (21). Felizmente, a lista de alvos terapêuticos potenciais tem crescido paralelamente com a nossa compreensão da etiopatogenia; como tivemos, recentemente, a oportunidade de rever, esta lista inclui alvos tão diversos como os canais de potássio Kv1.3 presentes nas células T, a indoleamina deoxigenase (IDO), receptores nucleares (para estrogénios, PPAR, receptor X hepático), heme-oxigenase tipo 1 (HO-1), fosfolipase A2 α , receptores dos canabinoides endógenos, e receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA (33).

A imunoterapia das doenças autoimunes pode ser dividida, genericamente, em dois tipos fundamentais de abordagem: específicas do antígeno-alvo, e não específicas (31, 34-36). Categorizando o processo imunopatogénico em várias fases, podem ser consideradas terapias dirigidas contra a fase de activação e expansão periférica das populações linfocitárias, adesão celular e transmigração da barreira hemato-encefálica, activação local de células apresentadoras de antígeno no SNC e mecanismos de amplificação da resposta imune intraparenquimatosa, e a fase efectora de desmielinização, lesão axonal e regeneração da lesão (31, 36). Formas de modificar a resposta imune, benéficamente, de forma não-específica, incluem a modulação da rede de citocinas no sentido anti-inflamatório (bloqueio de citocinas pró-inflamatórias, ou dos seus receptores, administração de citocinas anti-inflamatórias), o bloqueio inespecífico da apresentação de antígenos e das moléculas co-estimuladoras, a estimulação de mecanismos intrínsecos de controlo da inflamação (IDO, HO-1, PPAR), ou a interferência nos mecanismos de circulação linfocitária, adesão e migração transendotelial (bloqueio das quimiocinas, seus receptores, moléculas de adesão celular e metaloproteinases de matriz) (revisto em (35)).

Por outro lado, as modalidades terapêuticas baseadas nos antígenos-alvo da resposta autoimune, mimetizando a capacidade natural de indução de tolerância aos antígenos do próprio seriam, potencialmente, mais eficazes, e com menos efeitos adversos (31, 34, 36). Em vários modelos experimentais de doença autoimune já foi possível demonstrar a exequibilidade de desenvolvimento de terapias antígeno-específicas, através de três estratégias fundamentais: administração do antígeno-alvo por via tolerogénica (oral, nasal); administração do antígeno em formulação tolerogénica (solúvel, complexos solúveis MHC-peptídeo, com bloqueio concomitante da co-estimulação, como ligando peptídeo alterado, como uma quimera com imunoglobulinas, como vacina de ADN); administração de células T antígeno-específicas como imunogénio (revisto em (34)). Os mecanismos de acção destas formas de terapia incluem a deleção de clones auto-reactivos, anergia clonal, estimulação e expansão de populações de

células reguladoras, e desvio fenotípico T_{helper} , tipicamente de fenótipos pró-inflamatórios Th1 para anti-inflamatórios Th2 e Th3 (34). As bases fundamentais para o desenvolvimento de qualquer terapia antigénio-específica são, naturalmente, a identificação dos antígenos-alvo, e dos mecanismos implicados no despoletar da resposta imune contra eles; como vimos nos dois capítulos anteriores, para a EM esta tarefa não tem sido fácil, pela multiplicidade de alvos antigénicos potencialmente importantes, e pela complexidade dos mecanismos de reconhecimento e apresentação antigénico, e da dinâmica das populações linfocitárias auto-reactivas. Apesar dos enormes avanços obtidos ao longo das duas últimas décadas com a identificação progressiva dos mecanismos da autoimunidade, a maioria das abordagens imunoterapêuticas das doenças autoimunes experimentais não têm tido sucesso na transição para as correspondentes doenças humanas – um reflexo da nossa ignorância sobre os princípios concretos da resposta autoimune, e, também, da nossa dificuldade em identificar qual, ou quais, dos múltiplos alvos terapêuticos são, realmente, importantes (37). De facto, nem todas as fases da resposta imune são, provavelmente, bons alvos terapêuticos; somente actuando nos elementos pivotais (“tipping points”) da resposta imune é possível uma acção eficaz. A identificação destes elementos não tem sido simples, e, até recentemente, apenas dois tinham sido identificados: a citocina TNF e a molécula de adesão celular integrina $\alpha 4\beta 1$, que se revelaram importantes no tratamento da artrite reumatóide, psoríase, espondilite anquilosante, doença inflamatória intestinal e esclerose múltipla (37). Os riscos potenciais destas formas de terapia não-específicas, sobretudo o de aumento de infecções oportunistas, podem ser significativos, dado o seu impacto global sobre o Sistema Imune. Este facto foi, recentemente, ilustrado com o aparecimento de casos de LEMP (Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva) durante o tratamento com o anticorpo anti-integrina $\alpha 4$ natalizumab, e de tuberculose nos doentes tratados com o anticorpo anti-TNF infliximab (26, 37, 38). A alternativa a estas terapêuticas, com ganho no aumento de eficácia e na redução de riscos associados, é o desenvolvimento de imunoterapias antigénio-específicas,

considerado, por muitos, como o “Santo Graal” da terapêutica da autoimunidade, e possível, hoje, pelos desenvolvimentos experimentais neste campo (34, 37). O credo Hahnemanniano *simila similibus curantur*^f, ou, simplesmente, que o mesmo agente que provoca uma doença tem, também, a capacidade de a curar teria, desta forma, uma das suas mais conclusivas demonstrações.

2. Terapias antigénio-específicas na EAE e EM: imunomodulação no complexo trimolecular. Nota histórica sobre o desenvolvimento das terapias baseadas em antígenos no modelo de EAE.

Partindo do conceito de um complexo trimolecular (MHC-Ag-TCR) específico para a EM, é possível imaginar várias formas de terapêutica específica com capacidade de interferência nesta sinapse imunológica e, conseqüentemente, no desencadear da resposta autoimune. Estas alternativas incluem a modificação da activação e função das células CD4+ antigénio-específicas (e.g. por bloqueio da apresentação de antígeno, ou da ligação entre moléculas co-estimuladoras), inactivação das respostas linfocitárias T (e.g. anticorpos contra o complexo MHC-péptido, ou imunização com sequências da terceira região hipervariável do MHC), indução de anergia ou tolerância (e.g. vacinação com células T ou péptidos do TCR, tolerância oral, ligandos peptídeos alterados), indução de apoptose (por sobrecarga de antígeno), e mudança fenotípica dos linfócitos T (por enviesamento Th2) (36). Ao longo das últimas três décadas, várias destas alternativas foram já tentadas, a maioria com sucesso, no modelo experimental de EAE; muitas delas foram também já ensaiadas em ensaios clínicos piloto e de fase I/II, incluindo: tolerância oral à mielina; administração endovenosa de péptidos da MBP e complexos MBP-MHC; ligandos peptídeos alterados da MBP; AG isoladamente e em várias

^f Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843), fundador moderno da homeopatia. Hahnemann, C. Versuch über ein neues Prinzip zur Auffindung der heilkräfte der Arzneisubstanzen nebst einigen Blicken auf die bisherigen. *Journal der practischen Arzneykunde und Wundarzneykunst*, 1796.

associações; anticorpos anti-TCR, imunização com péptidos do TCR, e vacinação com células T (revisto (39-41)). É nosso propósito, nesta introdução, rever alguma da literatura referente às formas mais significativas de imunomodulação antigénio-específica, sobretudo para aquelas que já fizeram a transição para estudos em humanos; tivemos, recentemente, a oportunidade de publicar uma revisão sobre este mesmo tema (40). Cingir-nos-emos às formas de terapia derivadas dos antigénios-alvo, ou seja, não discutiremos a literatura referente às abordagens terapêuticas dirigidas contra o TCR, como os anticorpos anti-TCR, vacinação com péptidos do TCR ou com células T, que se encontra revista em vários trabalhos recentes (29, 39, 41).

A identificação do fenómeno da supressão antigénio-específica da EAE surgiu pouco tempo depois do estabelecimento deste modelo experimental em bases firmes no final da década de 1940 (como delineado no capítulo anterior). Deve-se a Armando FERRARO e a Carlo Lorenzo CAZZULLO, do *New York State Psychiatric Institute*, também envolvidos nesse processo desde o início, as primeiras publicações sobre a prevenção da EAE através de imunoterapia, em 1949-1950 (42-44). Segundo estes autores, “[...] the idea of utilizing brain substance as a devise for the prevention of the encephalomyelitis came to one of us [Ferraro] following a visit which he made last year in Rome to Cerletti who, at the time, was investigating the probable beneficial effects of “suspension” of brain substance obtained from electro-shocked animals and injected into patients suffering from mental diseases [...]”. Ugo CERLETTI, inventor e pioneiro da terapia com electrochoques nos doentes com esquizofrenia e depressão, considerava que esta terapia levava à produção, em virtude do *stress* metabólico causado, de substâncias denominadas acroagoninas^o por parte do tecido nervoso; estas

^o "Il mio concetto, dunque, che sottoponendo ripetute volte il cervello all'estremo cimento dato dall'elettroshock, si devono produrre nel cervello stesso sostanze di estrema difesa, o comunque altamente vitalizzanti, viene confermato in pieno... Individuate queste sostanze, attraverso gli esperimenti sull'uomo e sugli animali, è opportuno designarle con un nome. In base al sopra detto concetto, propongo di chiamarle sostanze di estrema, suprema (dal greco: *acros*) difesa o lotta (*agon*): acroagonine" Cerletti, U. Sostanze di estrema difesa prodotto doll Electroshock (Acroagonine). *Il Lavoro Neuropsichiatrico*, 1947, citado em

substâncias, presentes no encéfalo e libertadas para a corrente sanguínea poderiam, se transferidas para outros doentes, ter efeitos benéficos. No curso dos seus trabalhos, FERRARO e CAZZULLO não só eliminaram qualquer contributo dos electrochoques, mas descobriram que a imunização com emulsões de encéfalo em adjuvante incompleto de FREUND (i.e. sem a adição de micobactérias) protegia contra a indução subsequente de EAE pelo protocolo habitual. Quanto ao mecanismo desta protecção, colocaram duas alternativas: ou a imunização protectora levava à produção de anticorpos capazes de neutralizar a substância cerebral utilizada depois para a indução da doença; ou o inóculo protector serviria como “substância cerebral substituta”, capaz de deflectir a resposta imune para si, impedindo o ataque ao SNC (42, 44). Em outras experiências, os autores confirmaram que a utilização de imunizações protectoras de pequena dosagem tinha os mesmos efeitos que uma única imunização de grande dosagem, significando que o mecanismo deflector não seria importante, e apontado para o papel de “interferência” da resposta induzida pela imunização protectora (“dessensibilização gradual”) sobre a imunização indutora de doença; infelizmente, não foram apresentados mais dados sobre as características da resposta imune nestes animais^f (43, 44).

Nos anos seguintes, este fenómeno foi reproduzido algumas vezes, primeiro por CONDIE *et al.* (45), e ZEMAN (46), utilizando homogeneizado de medula espinal e, depois, por KIES *et al.* e SHAW *et al.* utilizando somente adjuvante (47, 48); já anteriormente LUMSDEN tinha postulado um papel protector semelhante para o adjuvante (49). Inna SVET-MOLDAVSKAYA e Giorgy SVET-MOLDAVSKY, do Instituto de Controle Estatal de Soros e Vacinas L.A. Tarasevich (Moscovo), reportaram que a injeção de cérebro de coelho recém-nascido em adjuvante completo induzia protecção, e propuseram que no cérebro adulto existiriam dois factores, um

Electric Bodies: Episodes in the History of Medical Electricity, Bertucci P e Pancaldi G. editores, *Università di Bologna*, Bolonha, Itália, 2001.

^f Uma breve nota sobre as limitações experimentais encontradas por estes autores: “Our data are necessarily incomplete inasmuch as, through lack of funds we could not obtain the collaboration of an immunologist who could at various intervals titrate the antibrain-antibodies in the serum and cerebrospinal fluid”. Um exemplo de candura científica com ecos negativos, ainda hoje pertinentes.

encefalitogénico e outro protector, enquanto no do recém-nascido apenas o segundo (50); mais tarde, os mesmos autores dividiram os tipos de “resistência adquirida” à EAE em três: central (obtida após imunização com o cérebro recém-nascido, e após recuperação da doença), interferência (obtida por administração da substância cerebral antes da imunização encefalitogénica), e periférica (administração de adjuvante) (51). Na mesma altura, Cheng-Mei SHAW, trabalhando no laboratório de KIES e ALVORD, trouxe à luz duas observações fundamentais. Na tentativa de encontrar evidências de hipersensibilidade cutânea retardada contra antigénios encefálicos, após indução de EAE com homogeneizado de cérebro, através de testes subcutâneos com proteínas básicas da mielina purificadas e em solução aquosa, foi descoberto que a imunização subcutânea repetida era capaz de suprimir o aparecimento de doença, e que este efeito era mediado por uma reacção imunológica específica contra as proteínas básicas da mielina, e não por qualquer outro mecanismo (52). Os autores fazem também, pela primeira vez, a distinção entre prevenção (tratamento feito antes da indução de doença), supressão (após indução e antes dos sinais clínicos) e tratamento (após aparecimento dos sinais clínicos). A evolução na descoberta dos antigénios proteicos da mielina levou a que fosse possível, mais tarde, conseguir o tratamento da EAE clinicamente activa, em macacos Rhesus, através de imunização com a proteína A1 humana (i.e. MBP), atingindo aquilo a que EYLAR denominou “paralisia imune” (53). A identificação dos epítomos antigénicos dentro da MBP para as várias espécies e estirpes (descrita no capítulo anterior) foi acompanhada de estudos por DRISCOLL *et al.*, CHOU *et al.*, e SWANBORG, que confirmaram a importância dos epítomos encefalitogénicos como indutores e protectores contra a doença (54-56), a capacidade de reduzir a encefalitogenicidade através da modificação de resíduos chave como o triptofano na sequência MBP113-121 para o cobaio (57), e a existência de epítomos protectores não-encefalitogénicos dentro da mesma proteína (58, 59).

A natureza da reacção protectora foi atribuída, durante bastante tempo, aos anticorpos fixadores de complemento (FC) produzidos após imunização; por exemplo, PATERSON e HARWIN relataram que a administração de soro colectado de ratos 3 a 6 semanas após imunização tinha capacidade protectora sobre outros ratos induzidos activamente com EAE, e que esta protecção era devida à presença de anticorpos FC (60). Estes anticorpos poderiam actuar por inibição da resposta imune activa durante a indução de EAE, embora os autores admitam que tal não explicaria a supressão da resposta celular; por impedir a produção de anticorpos FC após imunização activa, resultando em níveis inferiores aos necessários para a patogenicidade; ou por serem anticorpos não-patogénicos e “bloqueadores”, i.e., ligando-se aos locais antigénicos no SNC e impedindo o acesso ao antigénio aos anticorpos produzidos durante a imunização activa (60). Em alternativa a esta hipótese, ALVORD, SHAW e KIES continuaram a afirmar que todas as formas de inibição induzida por encefalitogénios funcionavam por supressão da resposta celular (61, 62); apesar disso, os autores reconheciam o papel importante dos anticorpos anti-mielina neste fenómeno. Salientavam, no entanto, as diferenças no papel de vários tipos de anticorpo: $\gamma 2$ patogénicos, obtidos após indução activa da doença, e $\gamma 1$ protectores, aparecendo mais tarde na reacção imune, ou após imunização com adjuvante incompleto (61). Estas classes corresponderiam, grosseiramente, à divisão dos anticorpos por centrifugação em 7S e 19S, tendo a última sido reportada como protectora por HARWIN e PATERSON (63). Mais tarde, a importância dos anticorpos na transferência de protecção foi sendo posta em causa, progressivamente, por exemplo através de experiências em que se demonstrou que a utilização de imunossuppressores durante a imunização protectora suprimia a produção de anticorpos anti-mielina, sem afectar a eficácia da protecção (64). A própria evolução do conceito etiopatogénico da EAE (como vimos no capítulo anterior) para o de uma doença mediada por linfócitos e não por anticorpos, era consistente com esta interpretação do fenómeno de protecção; nesse contexto, SWIERKOSZ e SWANBORG demonstraram que as células dos gânglios linfáticos de

animais protegidos por imunização com MBP eram capazes de transferir protecção contra a indução activa de EAE nos animais recipientes (65). Mais tarde, os mesmos autores confirmaram o carácter “supressor” destes linfócitos, e a sua especificidade antigénica para a MBP (66); BEN-NUN e COHEN caracterizaram imunologicamente estas células, identificaram-nas como as mesmas responsáveis pelas remissões espontâneas na EAE do rato, e como sendo linfócitos T (timo-dependentes) (67, 68) Hoje em dia, tal como temos visto, o conceito prevalente da etiopatogénese da EAE é o de uma doença centrada na resposta T CD4+ contra a mielina, e os mecanismos de acção das terapêuticas antígeno-específicas na EAE são explicados com base em alterações da dinâmica desta resposta celular T (indução de deleção e anergia clonal, enviesamento fenotípico Th2) (34).

3. Administração de mielina e seus componentes como terapia antígeno-específica. Terapêuticas parentéricas, tolerização oral e nasal, complexos MHC-mielina e proteínas de fusão.

No seguimento dos trabalhos de tratamento da EAE com proteína básica de mielina, como os de EYLAR e DRISCOLL acima mencionados, experiências iniciais de tratamento da EM pelo mesmo método foram iniciadas nos anos 1970. CAMPBELL *et al.*, e, depois, GONSETTE *et al.*, utilizaram injeções intramusculares de proteína básica de mielina dissolvida em soro fisiológico, no tratamento de doentes com formas crónicas e agudas, respectivamente. Partindo do pressuposto que a terapia com MBP deveria funcionar da mesma forma que a terapia de dessensibilização a antígenos nas doenças alérgicas, estes autores utilizaram baixas dosagens no tratamento (5 mg de MBP intramuscular por semana), e não conseguiram observar quaisquer efeitos benéficos (69, 70). Num trabalho de revisão sobre estes ensaios iniciais, Elsworth ALVORD apontou duas principais deficiências na elaboração destas experiências (71). Apesar de considerar a EAE e EM como fundamentalmente semelhantes, os resultados positivos reportados no tratamento com MBP eram muito dependentes da

espécie e estirpe do animal experimental, variando, por exemplo, entre as espécies *Macaca mulatta* (macaco Rhesus, empregue por EYLAR) e *Macaca fascicularis* (macaco-caranguejeiro, empregue por ALVORD) (72). Por outro lado, a dosagem empregue no tratamento dos doentes não era correspondente à dosagem eficaz nos modelos animais; os doentes receberam, em média, 0.07 mg/kg/semana em soro fisiológico, quando a dose correspondente no *M. fascicularis* seria de 67 mg/kg/semana (equivalente a toda a MBP de dois cérebros humanos por semana, por doente) (71). As dificuldades técnicas e a aparente ineficácia desta terapêutica nos ensaios iniciais levaram ao seu abandono até hoje, e à utilização de outras formas de administração de mielina e seus componentes.

Entre os factores que determinam as características da resposta imune, a via de contacto com o antigénio é das mais determinantes; de facto existem subsistemas de reconhecimento imune nas várias portas de entrada no nosso organismo, com diferenciações muito próprias incluindo o tipo de células presentes e a organização estrutural dos órgãos linfóides secundários locais. Por exemplo, na mucosa do tubo digestivo e do trato respiratório existe uma rede composta de células epiteliais com capacidade de apresentação antigénica, linfócitos residentes, e nódulos linfóides de variadas dimensões dispersos ao longo destes órgãos – no seu conjunto denominado MALT (*Mucose Associated Lymphoid Tissue*). Deste modo, contra um mesmo antigénio é possível obter diferentes respostas imunes consoante o local de reconhecimento inicial.

A administração oral de um antigénio é uma forma eficaz de induzir uma resposta imune tolerogénica contra o mesmo, um facto conhecido desde 1911, quando WELLS alimentou cobaios com proteínas de galinha, tornando-os resistentes à indução posterior de anafilaxia com as mesmas proteínas (citado em (73)). O tubo digestivo tem uma área de exposição a antígenos muito superior à da pele, contacta com cerca de 30 Kg de proteínas anualmente, dos quais absorve 130-190 gramas diariamente (74). Uma de três reacções imunes são possíveis neste contacto com antígenos orais: produção local de IgA segregada, sem inflamação; activação imune

com reacção inflamatória local e sistémica; activação imune com estabelecimento de tolerância local e sistémica (74). Os dois primeiros tipos de reacção ocorrem, predominantemente, no contacto com antígenos associados a agentes microbianos patogénicos, enquanto que a tolerização é a reacção comum aos antígenos presentes na alimentação e na flora comensal. Este último tipo de resposta imune evoluiu, provavelmente, como um análogo da tolerância ao próprio (*self*), destinado a impedir reacções de hipersensibilidade contra a miríade de antígenos presentes na alimentação – com algumas falhas, donde a existência ocasional de alergias alimentares.

A influência desta via de administração de antígenos sobre o Sistema Imune é muito profunda; quase todos os tipos de reacção imune antígeno-específica podem ser influenciados pela administração oral de antígeno (revisto em (74)); entre elas são particularmente susceptíveis, as respostas tipo Th1 inflamatórias e de hipersensibilidade de tipo retardado (tipo IV). Vários mecanismos são responsáveis por estes efeitos imunomoduladores; predominam, no entanto, a indução de anergia e deleção clonal, e a indução de células reguladoras capazes de supressão activa da resposta imune (revisto em (73, 74). A administração de baixas doses de antígeno favorece o desenvolvimento de células reguladoras, e, ao invés, doses elevadas induzem tolerância por anergia e deleção. Entre as células reguladoras potencialmente activadas por tolerização oral encontram-se populações de linfócitos T CD8+ (capazes de reconhecer antígenos da via exógena por *cross-presentation*, ou *cross-priming*), linfócitos T $\gamma\delta$ e NK-T, e, especialmente, linfócitos T CD4+ com fenótipo Th2 (produtoras de IL-4 e IL-10) e Th3 (produtoras de TGF β). Sobretudo estas últimas parecem ser um produto relativamente específico desta forma de tolerização, e células Th3 produtoras de TGF β têm provavelmente um papel central na regulação da resposta imune sistémica. Depois de activadas pela administração oral de antígeno, estas populações de células reguladoras poderiam migrar para locais de inflamação, onde exerceriam as suas acções benéficas de forma não antígeno-específica, por *bystander suppression* das células envolvidas no processo inflamatório. Vários factores podem aumentar, ou diminuir, a

eficácia da tolerização oral, incluindo, entre outros, a co-administração de citocinas, ou produtos bacterianos e parasitários; a administração oral de interferão beta ou tau (IFN τ) parece potenciar o efeito tolerogénico (revisto em (74)).

Dada a magnitude do efeito imunomodulador da administração oral de antígenos, existe uma extensa literatura sobre aplicações terapêuticas em doenças autoimunes ou inflamatórias, em modelos animais. A eficácia da tolerização oral foi já demonstrada no tratamento da EAE, artrite, diabetes melitus, doença inflamatória intestinal, uveíte, miastenia gravis, alergia, síndrome antifosfolípídico, nevrite autoimune experimental, doenças de imunocomplexos, e tiroidite, entre outras (revisto em (73, 74)). No que respeita a doenças humanas, ensaios clínicos foram realizados em doenças alérgicas e de hipersensibilidade de contacto, diabetes melitus, artrite reumatóide, uveíte, tiroidite autoimune, e esclerose múltipla (revisto em (74, 75)). Em relação a esta última, a administração de mielina bovina em ensaios clínicos foi iniciada nos anos 1990; a utilização de mielina total, ao invés de uma proteína ou péptido, teria a vantagem de superar o principal problema das terapêuticas antígeno-específicas, i.e. a escolha de antígeno-alvo para cada doente individual. Inicialmente, foi feito um ensaio clínico duplamente cego, no qual foram tratados 30 doentes com formas precoces de EM durante 1 ano, utilizando cápsulas de 300 mg de mielina bovina pasteurizada e liofilizada; a medicação foi bem tolerada, e resultou numa redução da percentagem de doentes com surtos durante esse período, bem como na redução da frequência de linfócitos T anti-MBP (76). No estudo de continuação de fase I/II em 34 doentes, foi possível detectar um aumento na frequência de linhas celulares T anti-MBP e anti-PLP com fenótipo Th3 (com base em ensaios de produção de TGF β *in vitro*) nos doentes tratados com mielina oral, em comparação com o grupo de controlo, sugerindo um efeito de enviesamento Th3 da terapêutica (77-79). Com base nestes resultados preliminares promissores, um ensaio de fase III duplamente cego foi realizado, no qual 515 doentes com EM forma de evolução por surtos e remissões foram tratados com uma dose oral única de 300 mg de mielina

bovina, contendo 8 mg de MBP e 15 mg de PLP. Infelizmente, não foi possível observar qualquer benefício clínico, existindo um grande efeito placebo no grupo-controlo (80); a análise do efeito terapêutico por RMN revelou uma tendência positiva no grupo de tratamento (75, 81). Estes resultados desapontantes levaram ao abandono da terapia com mielina oral na EM; em nossa opinião, no entanto, o ensaio clínico de fase III não foi conclusivo sobre a ineficácia do tratamento, quer pelo esquema terapêutico em dose única, quer pelo aparecimento de um efeito placebo tão relevante. Potencialmente, a terapia de tolerização oral poderá ser benéfica no tratamento da EM, e novos ensaios clínicos com maior poder deveriam ser realizados. Recentemente, foram feitos ensaios terapêuticos com administração de acetato de glatiramero (AG) oral, após experiências positivas na EAE (82, 83); os resultados deste ensaio duplamente cego e controlado por placebo (CORAL), em 1651 doentes com EM-SR, tratados com duas dosagens de AG oral diário (5 mg e 50 mg), não revelaram qualquer efeito benéfico clínico ou nos parâmetros da RMN (84, 85).

Embora menos testada que a anterior, a administração nasal de antígenos também se tem revelado promissora no tratamento de doenças autoimunes experimentais. Assim, a administração nasal de receptor da acetilcolina, MBP e mielina bovina de nervo periférico conferiu protecção contra a Miastenia Gravis experimental (EAMG), EAE e nevrite autoimune experimental (EAN), respectivamente (86), e XU *et al.*, foram capazes de tratar a EAE estabelecida com administração nasal de MBP68-86 conjuntamente com IL-10 (87). O efeito benéfico da tolerização oral parece ser dependente da idade, no entanto; a administração nasal de MBP durante o período neonatal leva à exacerbação da doença na idade adulta (88). Não existem, ainda, ensaios clínicos humanos para esta forma de tolerização de mucosa.

A administração endovenosa e intratecal de péptidos sintéticos derivados da sequência da MBP, como forma de tolerização a este antígeno, tem vindo a ser testada sobretudo por Ingrid CATZ e Kenneth WARREN. Dois ensaios clínicos iniciais, de fase I, foram realizados em doentes crónicos

progressivos com administração endovenosa ou intratecal do péptido MBP75-95 (89), e em doentes agudos e crónicos com o péptido MBP85-96 (90, 91). Clinicamente, não houve qualquer efeito observável, nem nenhum efeito adverso reportado. O tratamento endovenoso resultou numa redução dos títulos de anticorpos anti-MBP no LCR, com persistência até um ano após uma segunda dose de péptido; não foi reportado outro tipo de estudo imunológico (91). Um estudo posterior envolveu 56 doentes dos quais 41 receberam MBP82-98 endovenoso inicialmente e depois consoante o título de anticorpos anti-MBP no LCR. Destes doentes, 16 (39%) não tiveram qualquer efeito supressor no título de anticorpos, enquanto 15 (36%) tiveram supressão prolongada até um ano (92); este efeito prolongado dependia do haplotipo HLA, nomeadamente da presença do alelo DR2. Não foram ainda publicados quaisquer dados referentes ao seguimento clínico ou neurorradiológico destes doentes, pelo que se torna impossível avaliar a eficácia desta terapêutica. Os resultados de um outro ensaio de fase II, realizado pelos mesmos autores, foram recentemente comunicados na reunião da *American Academy of Neurology*; neste ensaio duplamente cego, 32 doentes com EM progressiva foram randomizados para receber 500 mg de MBP82-98 endovenosamente a cada 6 meses, durante 2 anos. O subgrupo de doentes com HLA-DR2 ou DR4 parece ter evidenciado um melhor prognóstico, com atraso da progressão da incapacidade neurológica e redução dos títulos de anticorpos anti-MBP; não foram reportados outros resultados da avaliação clínica, imagiológica ou imunológica (93). Até essa altura, os dados existentes não parecem apoiar o uso deste tipo de terapêutica, nem é claro qual o seu efeito imunomodulador.

Outra forma de terapia com capacidade de indução de tolerância contra antígenos é a administração de células linfóides “modificadas” pelo antígeno, ou a sua administração após ligação química com células apresentadoras, i.e. do antígeno no contexto do MHC apresentador (94, 95). Após experiências iniciais nos modelos de artrite e tiroidite autoimune, SRIRAM e STEINMAN demonstraram que a administração de esplenócitos quimicamente ligados com MBP conferia protecção contra a indução

subsequente de EAE em ratinhos SJL/J (96); o mesmo resultado foi depois obtido por KENNEDY *et al.* para a mesma estirpe utilizando esplenócitos carregados com PLP (97). Na sequência destes trabalhos iniciais, BEN-NUN e YOSSEFI replicaram estes resultados, utilizando macrófagos e linfócitos B como células apresentadoras de antígeno, e demonstraram que as membranas derivadas de macrófagos carregados com MBP tinham a mesma capacidade imunomoduladora, ou seja, que bastava a presença das moléculas de MHC e antígeno para obter o efeito terapêutico (98). Esta hipótese foi depois confirmada por SHARMA *et al.*, utilizando complexos MHC-Ag solúveis (300 µg da molécula de MHC classe II I-A^s conjugada com MBP91-103, ou 45 mg de I-A^s conjugada com PLP139-151) na prevenção da EAE em ratinhos SJL/J, no que respeita às manifestações clínicas e histológicas da doença (99). Mais tarde, a utilização de complexos dos domínios $\alpha 1\beta 1$ da molécula de MHC classe II RT1.B com a MBP69-89 foi eficaz na prevenção e tratamento da EAE estabelecida, em ratos Lewis, através da inibição antígeno-específica da proliferação linfocitária (100). Esta inibição poderia ser provocada através da ligação do complexo $\alpha 1\beta 1$ RT1.B/MBP69-89 com o TCR; a ausência das cadeias $\alpha 2\beta 2$ impediria a interacção com a molécula co-estimuladora CD4 e, assim, o segundo sinal co-estimulador necessário à activação linfocitária (100).

A administração destes complexos MHC-Ag foi testada num ensaio clínico multicêntrico, no qual 33 doentes com formas secundariamente progressivas de EM (com e sem surtos) foram tratados com três infusões endovenosas do complexo solúvel DR2:MBP84-102 (AG284) no espaço de uma semana, sendo depois observados durante as 12 semanas seguintes; somente doentes heterozigóticos para o alelo DR2 (DRB1*1501) foram incluídos no ensaio, de forma a aumentar as probabilidades de sucesso da terapia (101). Embora a segurança e tolerabilidade deste fármaco fossem boas (o objectivo primário do estudo), nenhuma das medidas clínicas ou imagiológicas foi influenciada positivamente, e não houve redução da reactividade *in vitro* dos linfócitos T contra a MBP ou a MOG (101). Uma vez que a maioria dos doentes incluídos neste estudo tinham níveis de

incapacidade elevados, e baixa actividade inflamatória na RMN encefálica, as probabilidades *a priori* de eficácia clínica eram reduzidas, pelo que não é possível julgar o potencial desta terapia apenas por este ensaio; infelizmente, não foram publicados mais resultados sobre este fármaco até ao presente.

Uma última estratégia de administração terapêutica de antígeno de mielina consiste na elaboração de proteínas de fusão contendo vários antígenos-alvo de interesse. Estas proteínas de fusão contendo vários epítomos potenciais poderiam ser processadas *in vivo* de forma a induzir efeitos imunomoduladores sobre vários alvos antigénicos, superando, assim, o problema levantado pela diversificação de epítomos, ou pelo desconhecimento do epítomo imunodominante no humano. Inicialmente, ELLIOTT *et al.* produziram uma proteína de fusão, consistindo na isoforma de 21.5 kD da MBP (MBP21.5) e numa modificação genética da PLP (Δ PLP4), cujos componentes poderiam ser processados para apresentação de vários epítomos antigénicos (102). A administração endovenosa desta proteína – MP4 – revelou grande eficácia na prevenção e tratamento da EAE, por imunização activa e transferência de linhas celulares anti-PLP, no ratinho SJL/J (103). Os efeitos imunomoduladores desta proteína incluíram a supressão da resposta proliferativa T contra a MBP e PLP, possivelmente por deleção ou anergia clonal (103). Esta proteína de fusão demonstrou eficácia terapêutica igualmente no modelo de EAE no primata não-humano *Callithrix jaccus*, levando à supressão de sinais clínicos e imagiológicos da doença (104). Para além deste interesse terapêutico, a proteína MP4 tem também sido utilizada para indução de EAE na estirpe C57BL/6 de ratinho, e no *C. jaccus*, neste último caso de forma a avaliar as alterações imagiológicas na RMN durante a fase de desenvolvimento pré-clínico deste fármaco (105, 106). Uma outra proteína de fusão foi construída por ZHONG *et al.*, neste caso incluindo apenas as regiões encefalitogénicas com importância na EAE das proteínas MBP (p7-50, p83-106, p142-168), PLP (p20-60, p84-116, p139-155) e MOG (p1-25, p32-56, p63-97). A administração endovenosa, ou intraperitoneal, desta proteína (hmTAP –

human multitarget autoantigen protein) demonstrou eficácia na prevenção e tratamento da EAE em ratinhos SJL/J, e resultou numa supressão da EAE após transferência de linhas celulares contra qualquer das três proteínas codificadas (107).

Em resumo, apesar de ainda nenhuma destas terapias ter demonstrado eficácia clínica em ensaios nos doentes com EM, em nossa opinião a qualidade e quantidade dos dados experimentais existentes justificam a continuação do interesse nestas formas de terapêutica antigénio-específica. Nos poucos ensaios clínicos realizados houve vários erros de desenho que, provavelmente, impediram a detecção de efeitos benéficos; má selecção de doentes e controlos (sobretudo nas fases progressivas, não-inflamatórias da doença, efeito placebo exagerado), número de doentes pouco significativo, e má escolha de dosagem dos fármacos (no caso do ensaio da mielina oral), tal como ALVORD avisava há quase 30 anos atrás (71). Em alguns casos, após ensaios de fase I, não foram ainda reportados mais dados, provenientes de estudos de fase II; uma vez que os estudos de fase I se destinam, sobretudo, à avaliação da segurança e tolerabilidade, não deveriam ser tiradas ilações sobre a eficácia que impedissem o desenvolvimento do fármaco em fases subsequentes. Resta-nos aguardar a realização destes ensaios clínicos, e os seus resultados, para poder tirar conclusões sobre a eficácia desta forma de imunomodulação antigénio-específica.

4. Desenvolvimento de copolímeros terapêuticos. O acetato de glatiramero (AG) e seus mecanismos de acção. Novos copolímeros baseados na estrutura molecular do MHC.

As investigações desenvolvidas com a intenção de descobrir os determinantes encefalitogénicos presentes na mielina levaram, no final da década de 1960, ao desenvolvimento da única terapia baseada em antigénios em uso corrente, o acetato de glatiramero (AG) ou copolímero-1 (Cop-1). Esta molécula, criada pela dupla de investigadores Michael SELA e Ruth

ARNON no Instituto de Ciência WEIZMANN em Rehovot (Israel), foi fruto de um processo de descoberta por serendipidade, como a seguir veremos. O AG é o sal acetato de um copolímero^f dos amino-ácidos L-alanina, L-lisina, L-glutamato e L-tirosina (Glutamato-Lisina-Alanina-Tirosina-poliMERO, ou GLATiraMERO), de sequência aleatória e comprimento entre 40 a 100 resíduos amino-acídicos (variável entre lotes), e com uma razão molar fixa de 4.2:3.4:1.4:1.0 respectivamente (Figura 1) (108, 109). A sua eficácia na prevenção e tratamento da EAE foi confirmada em múltiplos modelos e em várias espécies (ratinhos, ratos, cobaios, coelhos, macacos Rhesus, babuínos), após indução com diversas proteínas de mielina, incluindo a MBP, PLP139-151 e MOG35-55 (revisto em (108, 109)). A composição do AG foi desenhada de maneira a simular a MBP (segundo SELA, “starting from basic research without the prior intention of reaching a practical goal” (109)), de forma a produzir um encefalitogénio mais potente na indução de EAE; nesta altura, a MBP era o único encefalitogénio bem conhecido, mas pouco mais que a sua composição amino-acídica era conhecida.



Figura 1. Estrutura primária do acetato de glatiramero (AG). O AG é o sal acetato de um co-polímero aleatório dos aminoácidos L-alanina (A), L-lisina (K), L-glutamato (E) e L-tirosina (Y) na razão molar fixa de 4.2:3.4:1.4:1.0. Cada lote é composto de uma mistura de moléculas de diferentes tamanhos (entre 40 a 100 resíduos); no exemplo acima, mostramos 4 co-polímeros aleatórios para uma molécula de AG com 50 resíduos amino-acídicos (5 tirosinas, 7 glutamatos, 17 lisinas e 21 alaninas). Como se pode observar, é possível obter uma grande diversidade de combinações aleatórias com base nas permutações possíveis; naturalmente, dada a frequência variável de cada aminoácido, algumas combinações ocorrem com frequência superior a outras.

^f Um copolímero, ou heteropolímero, é um polímero formado pela associação de dois, ou mais, monómeros na mesma cadeia polimérica. Existem vários tipos de copolímero: aleatório (A-A-B-B-A-A-B-A-B-A-), alternante (-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-) ou em bloco (-A-A-A-A-B-B-B-B-A-A-A-).

O interesse inicial das investigações destes autores centrava-se na resposta imune contra o componente lipídico dos antígenos polipeptídicos, de interesse para o estudo de doenças da mielina, como a EM; dadas as dificuldades de solubilidade destes componentes, era necessário conjugá-los com copolímeros sintéticos de amino-ácidos (revisto em (110)). Tendo sido posta a hipótese de que a EAE induzida pela MBP fosse induzida, na realidade, mediada por uma reacção imune contra um lípido, e que esta proteína básica servisse apenas como portadora dos lípidos ácidos (e.g. fosfolípidos), vários copolímeros básicos, baseados na sequência da MBP, foram sintetizados, e tentativas de indução de EAE foram feitas utilizando emulsões em adjuvante completo. Não só estas tentativas foram infrutíferas, como a utilização de soluções aquosas destes copolímeros de carga positiva (como o Cop-1) demonstrou ser capaz de suprimir a indução subsequente de EAE (111, 112), ou seja, os polímeros sintéticos evidenciavam a mesma capacidade que a MBP, ou os seus determinantes encefalitogénicos, de protecção e tratamento deste modelo experimental (110). Após confirmação destes resultados em várias espécies diferentes de animal experimental (revisto em (108)), incluindo, significativamente, em primatas não-humanos (macacos Rhesus) (113), foram realizados ensaios clínicos em doentes. Numa primeira fase, 3 doentes com encefalomielite aguda disseminada (EMAD) e 4 doentes com EM foram tratados por injeção subcutânea de Cop-1; dada a duração limitada do tratamento (2 semanas para os doentes com EMAD, e 2 a 5 meses para a EM), este ensaio serviu apenas para confirmar a segurança do copolímero (114); um segundo ensaio em 12 doentes com formas progressivas e 4 com surtos e remissão confirmou a segurança e a eficácia potencial do produto (115). Posteriormente, foi realizado um ensaio piloto duplamente cego, incluindo 50 doentes sofrendo de EM por surtos e remissões, tratados com 20 mg de Cop-1 ou placebo, diariamente, durante 2 anos; neste ensaio, foi observada uma redução substancial da taxa de surtos (2.7 para o grupo placebo, contra 0.6 no grupo tratado) e uma tendência para a redução da incapacidade neurológica (116). Um ensaio subsequente do Cop-1 em doentes com formas crónicas progressivas não teve resultados

positivos, apesar da existência de uma tendência positiva na progressão da incapacidade (117). Por fim, a realização de ensaios clínicos multicêntricos, duplamente cegos, controlados por placebo, com números significativos de doentes, confirmou a eficácia deste fármaco na redução da taxa de surtos em cerca de 30%, e levou à sua aprovação para o tratamento de doentes com formas de evolução por surtos e remissões (118, 119). Ao longo dos anos seguintes, outros ensaios confirmaram o papel deste fármaco no tratamento da EM: efeitos positivos em várias medidas paraclínicas de eficácia como a RMN, a manutenção da eficácia clínica a longo termo, sobretudo em relação à redução da taxa de surtos, e sua ineficácia nas formas primariamente e secundariamente progressivas da doença, e mais recentemente, a sua ineficácia por via oral (revisto em (120, 121)). Como anteriormente dissemos, o AG faz parte dos fármacos de primeira linha do arsenal terapêutico comumente empregue para o tratamento das fases precoces da EM.

A forma pouco ortodoxa como este fármaco foi desenvolvido – partindo da tentativa de obtenção de um encefalitogénio mais potente – reflecte-se nas incertezas existentes, ainda hoje, no que respeita ao seu mecanismo de acção. Os resultados provenientes dos ensaios terapêuticos na EAE, e em alguma medida dos poucos trabalhos realizados em doentes tratados com o fármaco, demonstram várias interações potenciais do AG com o Sistema Imune: a existência de elevadas frequências de células T reactivas ao AG em doentes não tratados, e a redução da capacidade proliferativa ao AG com o tratamento; enviesamento fenotípico de Th1 para Th2 com o tratamento; redução da capacidade migratória linfocitária; degeneração do reconhecimento pelo TCR levando a reactividade cruzada com outros antigénios de mielina como a MBP ou a MOG; inibição da proliferação de células T específicas para a MBP; interações directas e promíscuas com o MHC e TCR; efeitos inibitórios sobre células apresentadoras de antigénio e.g. monócitos (revisto em (122, 123)). Com base nestes dados o modelo de acção proposto para o AG inclui (Figura 2): a) competição na ligação ao MHC, e interferência na ligação ao TCR, com outras moléculas de mielina na periferia; este mecanismo provavelmente terá pouca relevância *in vivo*,

uma vez que o AG não penetra no SNC; b) indução de anergia, ou redução da capacidade de migração, de linfócitos T reactivos contra antígenos da mielina presentes na periferia; c) enviesamento fenotípico Th2 de células AG-reactivas, seguido da migração destas células para o SNC, onde, após reacção cruzada com os antígenos de mielina apresentados localmente, são produzidas citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF β) capazes de modulação da resposta inflamatória local através de supressão do vizinho (*bystander suppression*), e neurotrofinas (BDNF) capazes de estimular a regeneração no local da lesão (revisto em (122, 124)). Este último mecanismo é, actualmente, o mais favorecido pelos dados experimentais, que, de seguida, iremos rever. Recentemente, novos mecanismos potenciais têm sido invocados para explicar os efeitos imunomoduladores do AG. Em primeiro lugar, o reconhecimento da promiscuidade de ligação do AG a vários MHC, e a descoberta de que o tratamento com AG provoca a expansão selectiva de uma população de linfócitos T de fenótipo Th2 e capacidade de reconhecimento degenerado (i.e. com capacidade de reacção cruzada com vários antígenos da mielina), levou a que se propusesse o AG como um ligando peptídico alterado “universal” (125). A sequência aleatória deste fármaco, e a presença de resíduos amino-ácídicos com potencial para servirem de âncora do MHC, e contacto com o TCR, tornaria possível a estimulação de uma grande variedade de células T com diversos TCR, e, consequentemente, com um repertório de reconhecimento vasto, incluindo várias proteínas da mielina (125). Por outro lado, para além dos efeitos sobre os linfócitos T, o AG poderá interferir de várias maneiras com as células apresentadoras de antígeno, levando a modificações do seu fenótipo, tais como a redução do seu estado de activação e capacidade de apresentação, inibição da secreção de IL-12 e TNF, e aumento da secreção de IL-10 que, no seu conjunto, seriam indutoras de enviesamento Th2 ; por outro lado, as células Th2 poderiam igualmente induzir mudanças fenotípicas recíprocas nas APC presentes no SNC para o tipo 2, amplificando, assim, localmente, a diferenciação Th2 (revisto em (126)).

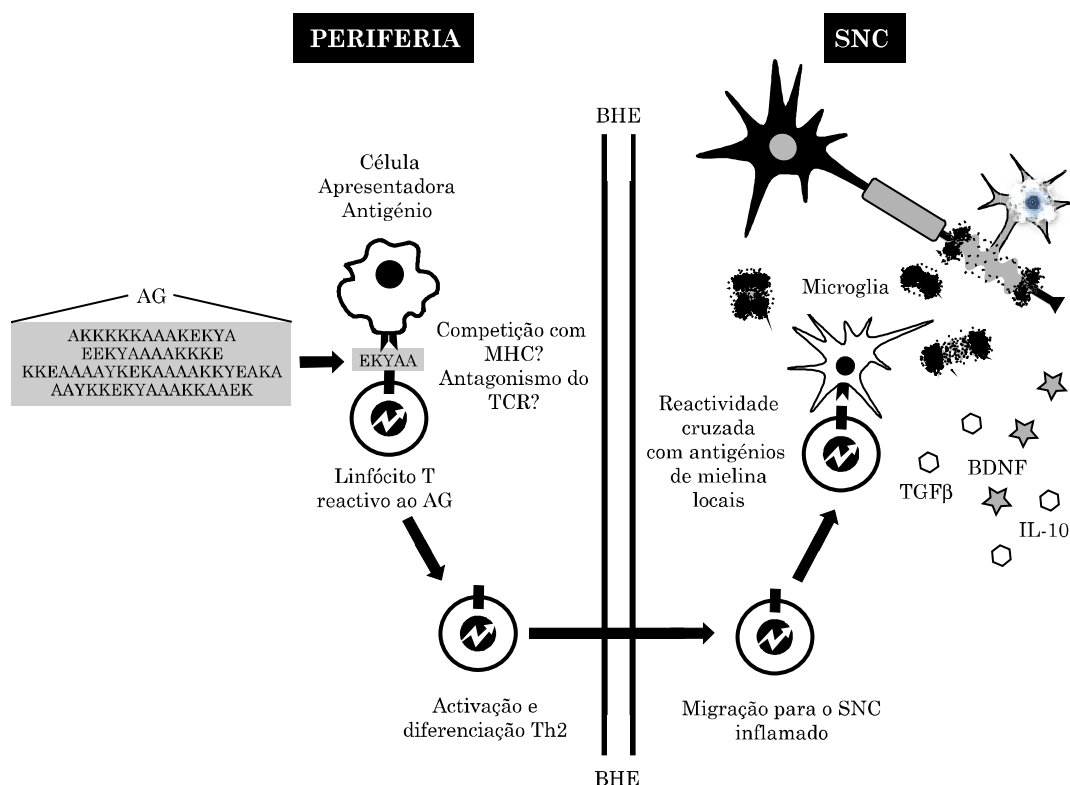


Figura 2. Mecanismos de acção do acetato de glatiramero (AG). Dentro dos vários mecanismos através dos quais o AG pode influenciar a resposta imune, o mais provável é que o tratamento crónico com AG leve à estimulação e diferenciação fenotípica de uma população linfocitária T anti-AG à periferia. Estes linfócitos reconhecem o AG com elevado grau de degenerescência de reconhecimento, e diferenciam-se para um fenótipo Th2. Após migração para o SNC inflamado, estas células reconhecem autoantígenos de mielina apresentados localmente por células apresentadoras de antígeno, e exercem uma influência benéfica sobre a resposta imune através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TGFβ, IL-10) e neurotrofinas (BDNF). MHC – *major histocompatibility complex*; TCR – *T cell receptor*; BHE – barreira hematoencefálica; SNC – Sistema Nervoso Central; TGFβ – *Transforming growth factor beta*; IL-10 – interleucina 10; BDNF – *Brain derived neurotrophic factor*.

O esclarecimento dos mecanismos de acção do AG foi inicialmente investigado no contexto da sua interferência com a formação do complexo trimolecular patogénico. No que respeita à resposta linfocitária T, a capacidade do AG de suprimir a proliferação contra a MBP foi demonstrada *in vitro* utilizando linhas celulares de ratinho com restrições MHC diversas, na presença de ambos os antígenos; esta interferência era baseada numa

competição dose-dependente e específica para o AG (127). O mesmo fenómeno foi mais tarde descrito em linhas celulares humanas com várias restrições DR, e, neste caso, o efeito de interferência entre os dois antígenos mostrou ser dependente da presença de APCs, levando a supor a existência de competição para a ligação ao MHC (128). Utilizando ensaios de proliferação com linhas celulares humanas e murinas, AHARONI *et al.* foram capazes de discriminar a existência de antagonismo de TCR, para além de competição com o MHC; neste caso, a presença de AG na molécula de MHC era suficiente para inibir de forma competitiva e específica o efeito do antígeno MBP82-100 (129). Neste antagonismo do TCR, o complexo AG-MHC é suficiente para se ligar ao TCR, e resulta na inactivação funcional do receptor. Em relação à sua ligação às moléculas de MHC, FRIDKIS-HARELI *et al.* testaram a capacidade de ligação do AG, bem como da MBP e do péptido MBP84-102, a diversas moléculas de MHC do ratinho (sistema H-2) e humano (DR). Os seus resultados confirmaram que o AG tinha capacidade de ligação promíscua a diversas moléculas MHC presentes em APC de várias estirpes de ratinho com diferentes genes H-2 (Balb/c, SJL/J), e em linhas celulares B imortalizadas por infecção EBV provenientes de doentes com EM e controlos normais (antígenos DR2,7; DR7,w11; DR3; DR2,w6; DR4; DR7; DRw11; DR2,w13) (130); provas directas da ligação do AG a moléculas purificadas de HLA-DR1, DR2 e DR4 foram obtidas mais tarde pela mesma autora (131). Dentro da sequência amino-ácídica aleatória do AG, era, naturalmente, interessante identificar qual o padrão molecular reconhecido pelas moléculas de MHC. Utilizando as mesmas moléculas purificadas de HLA-DR, FRIDKIS-HARELI *et al.* eliminaram por tratamento com peptidase N-terminal os resíduos amino-terminais da molécula de AG, protrudentes do MHC, eluíram a restante molécula (contendo presumivelmente o epítipo de ligação) e procederam à sua separação por cromatografia líquida de alta pressão e sequenciação. Ao contrário dos padrões inconstantes espectáveis de um copolímero aleatório, um padrão relativamente estável foi encontrado para o epítipo de ligação a estas três moléculas de MHC, consistindo de uma tirosina (Y) na posição P1,

precedida de um glutamato (E) na posição P-2, e uma lisina (K) na posição P-1, e seguida de quatro alaninas (A) nas posições P4-P9 (132). A tirosina P1 seria o principal resíduo-âncora para as moléculas de MHC. Uma elevada percentagem das moléculas de AG (cerca de 95% para os alelos DR1 e DR4, e 80% para DR2) estavam ligadas a moléculas DR, levando à presunção que este padrão epitópico de ligação estaria presente em quase todas as moléculas de AG com pelo menos 75-80 amino-ácidos de comprimento (132).

A capacidade de enviesamento fenotípico Thelper é provavelmente o principal mecanismo responsável pela acção terapêutica do AG. Inicialmente, foi demonstrado que a protecção conferida pelo AG era transferível entre animais, efeito atribuído à presença de células supressoras induzidas pelo fármaco (133). A caracterização destas linhas celulares *in vitro* confirmou tratarem-se de linfócitos de fenótipo Th2, com reactividade cruzada para o AG e a MBP, e capazes de transferir protecção contra a EAE induzida activamente com homogeneizado de medula espinal (134). Apesar de não haver reactividade contra a PLP, estas células revelaram-se capazes de suprimir a proliferação de linhas celulares específicas contra esta proteína, e também de tratar a EAE induzida com os péptidos PLP139-151 e PLP178-191 – evidências do fenómeno de supressão do vizinho (*bystander suppression*) (135). De seguida, AHARONI *et al.* isolaram linhas celulares Th2 anti-AG a partir do encéfalo de ratinhos tratados com AG, e após transferência adoptiva estas linhas celulares Th2 anti-AG eram observáveis no parênquima encefálico de ratinhos saudáveis tratados apenas com *pertussis* de forma a provocar uma quebra na barreira hemato-encefálica (136). Estes dados foram interpretados como evidência de que o tratamento com AG era capaz de induzir linhas celulares específicas com capacidade migratória para o SNC, onde exerceriam um efeito benéfico baseado na secreção de citocinas anti-inflamatórias (136).

Estudos realizados em doentes tratados com AG vieram confirmar a existência deste efeito imunomodulador de enviesamento Th2. Após tratamento durante 12 meses com AG em 10 doentes de EM, os níveis séricos de IL-10 aumentaram, conjuntamente com um aumento do ARNm da

IL-4 e TGF β , e uma diminuição do ARNm do TNF em linfócitos totais do sangue periférico (137). A capacidade do AG actuar como um “antigénio universal” foi testada por DUDA *et al.*, que avaliaram o efeito do tratamento prolongado com este fármaco sobre capacidade proliferativa das células anti-AG e células T anti-MBP84-102, contra os seus antigénios cognatos, um painel de péptidos combinatórios baseados na sequência da MBP84-102 e um péptido totalmente aleatório. Linhas linfocitárias T específicas para o AG e MBP84-102 foram derivadas a partir de células mononucleares de sangue periférico de doentes tratados com AG, e a proliferação testada antes do início do tratamento e em vários momentos ao longo de um período de 12 meses. Antes do início do tratamento, foi possível observar a existência de uma população significativa de linfócitos T naive reactivos contra este copolímero artificial (frequência de precursores T de 1:5000 até 1:100000); após o início do tratamento, houve uma diminuição significativa da proliferação contra o AG, e um enviesamento fenotípico destas células para Th2. Curiosamente, ao longo do tratamento com AG, as linhas celulares específicas para este fármaco evidenciaram uma progressiva degenerescência de reconhecimento, passando a reagir também contra o epítopo imunodominante MBP84-102, e contra vários dos péptidos combinatórios, nos quais um ou mais resíduos amino-acídicos foram substituídos de forma aleatória (138). Houve, igualmente, o aparecimento aos 6 e 12 meses de linhas celulares T com reconhecimento degenerado e fenótipo Th2 (138). No seu conjunto, este trabalho demonstrou que o tratamento com AG leva a uma deleção inicial de linfócitos Th1 de alta avidéz, seguida de uma expansão progressiva de linhas celulares de baixa avidéz, elevada degenerescência e fenótipo Th2, capazes de, após migração para o SNC, reconhecerem localmente por mecanismos de reactividade cruzada, outros antigénios de mielina, exercendo então efeitos de supressão do vizinho benéficos (138). Na mesma altura, NEUHAUS *et al.* publicaram um trabalho no qual estudaram a evolução temporal fenotípica das linhas celulares anti-AG em controlos saudáveis, e doentes tratados, ou não, com AG. Após estabelecimento de 721 linhas celulares anti-AG *in vitro*, estes

autores utilizaram citometria de fluxo com marcadores intracelulares para estudar a produção de IFN γ e IL-4 por estas células, obtendo assim um perfil Th0, Th1 ou Th2 consoante a quantidade destas citocinas produzidas após estimulação. A maioria das linhas celulares anti-AG nos controlos e doentes não tratados com AG tinham um fenótipo Th1, enquanto que nos doentes tratados com AG este fenótipo era Th2, tal como anteriormente tinha sido reportado (139). Mais, a estimulação destas linhas Th2 com MBP confirmou a existência de reactividade cruzada, resultante na produção de citocinas anti-inflamatórias. Por último, num subgrupo de doentes testados antes e depois do início da medicação com AG, foi possível confirmar o efeito benéfico deste fármaco sobre a evolução do fenótipo Th ao fim de 1 mês de terapêutica – ou seja, o perfil temporal da resposta Th anti-AG revelou uma enviesamento Th2 progressivo, tal como anteriormente tinha sido postulado (139). Posteriormente a estes trabalhos, resultados semelhantes obtidos por outros autores vieram confirmar o efeito terapêutico do AG sobre a proliferação das linhas celulares anti-AG e seu fenótipo Th (140-144), bem como a capacidade de reactividade cruzada contra outros antígenos da mielina (145).

Outros mecanismos de acção, para além da indução de populações Th2 anti-AG com capacidade de reactividade cruzada, têm vindo a ser descobertos. Por um lado, o tratamento com AG leva à expansão de uma população de linfócitos T CD8 $^{+}$ restritos a MHC classe I, com capacidade de produção de IFN γ , que poderão eventualmente contribuir para o efeito imunomodulador deste fármaco (143, 146); estas células CD8 $^{+}$ têm um fenótipo de activação crónica e demonstraram capacidade citotóxica e supressora, provocando, por exemplo, morte directa de células CD4 $^{+}$ activadas, através de um mecanismo que envolve a apresentação de AG no contexto da molécula HLA-E (147, 148). Os efeitos do AG sobre a capacidade de apresentação de antígeno foram já acima comentados; resumidamente, o tratamento com AG leva a uma redução da reactividade monocitária *in vitro* e *in vivo* (149), bloqueia a sua activação pelo IFN γ (150) e pelo lipopolissacárido, resultando numa diminuição dos marcadores de activação

CD150/SLAM, CD25, CD69 e da produção das citocinas TNF e IL-12, bem como num aumento da IL-10, o que possivelmente levaria ao enviesamento Th2 da resposta imune ((143, 151), revisto em (126)). Um outro mecanismo de acção com potencial importância é a capacidade evidenciada pelas linhas celulares anti-AG de produção de neurotrofinas, nomeadamente o BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*). A produção de neurotrofinas como o BDNF, e a presença do seu receptor gp145trkB nas lesões desmielinizantes tinha já, anteriormente, sido demonstrada por KERCHENSTEINER e STADELMAN (152-154). A partir de linhas celulares Th1 e Th2 anti-AG, ZIEMSEN *et al.* confirmaram a mesma capacidade de síntese de BDNF através de detecção de ARNm, ELISA e marcação intracelular (155); mais ainda, a frequência de linhas celulares anti-AG capazes de produzir BDNF foi de 14%, contra apenas 1% das linhas anti-MBP, num trabalho posterior (156). A secreção *in situ* desta neurotrofina foi confirmada no modelo de EAE por AHARONI *et al.*, conjuntamente com a produção de citocinas Th2/Th3 (157). Mais recentemente, foi relatado que o tratamento com AG eleva os níveis séricos de BDNF nos doentes com EM (158), e que no modelo experimental o tratamento com AG resulta num aumento da produção das neurotrofinas BDNF, NT-3 e NT-4 nas lesões desmielinizantes, com possível efeitos neuroregeneradores locais (159). A produção de neurotrofinas por parte das linhas celulares anti-AG poderia ter grande interesse, pela sua capacidade neuroprotectora e neuroregenerativa, não só para a EM, mas para uma série de doenças neurodegenerativas ou inflamatórias (160, 161); este conceito de “autoimunidade neuroprotectora” foi já empregue pelo grupo de Michal SCHWARTZ na terapia de modelos experimentais de neuropatia óptica (162), glaucoma (163), e doenças do neurónio motor (164). Uma outra estratégia de investigação dos mecanismos de acção do AG poderá vir da utilização de tecnologia de *screening* em massa para estudar o efeito deste fármaco sobre o perfil de expressão de ARNm. Um estudo recente utilizou uma tecnologia de *spotted array* para avaliar a expressão de 34 genes relacionados com a resposta imune, incluindo várias citocinas, quimiocinas e seus receptores; a partir das células mononucleares de sangue periférico de

12 doentes com EM tratados com AG, foram identificadas diminuições significativas dos genes Fas, CXCR3, P-selectina, ApoE e CCR5, bem como um aumento da IL-12p40 (165). Este tipo de estudo, pela sua natureza intrinsecamente aberta, tem a capacidade de evidenciar mecanismos de acção insuspeitos, mas que poderão contribuir para a compreensão das potencialidades terapêuticas deste fármaco. Do que acima foi dito, pode-se concluir que em relação ao AG, a demonstração da sua eficácia clínica precedeu largamente o esclarecimento do seu modo de acção, assunto ainda hoje em investigação; esta inversão do processo racional de desenvolvimento de fármacos reflecte a serendipidade da sua descoberta.

Os progressos obtidos na caracterização estrutural da molécula de MHC classe II HLA-DR2a e 2b (descritos no capítulo precedente) possibilitaram o desenho de copolímeros com maiores capacidades de ligação, e potencialmente maior efeito terapêutico. Com base no padrão de ligação ao HLA-DR, FRIDKIS-HARELI *et al.* desenharam copolímeros em que a tirosina do AG (YEAKE) foi substituída por uma valina (VEAKE) ou uma fenilalanina (FEAKE), com o intuito de providenciar um melhor resíduo de ligação para a bolsa P1 da molécula DRB1*1501; numa fase seguinte, copolímeros aleatórios de três e quatro aminoácidos (YFAKE e FAKE) foram testados. Destes polímeros, o FEAKE e YFAKE foram os mais eficazes, e, mais ainda, este último superou a eficácia do AG na supressão da EAE induzida em ratinhos SJL/J com PLP139-151 (166). Num modelo de EAE “humanizado” (ratinhos transgénicos possuindo o gene humano HLA DRB1*1501 e o TCR anti-MBP85-99 de um doente com EM), ILLÉS *et al.* testaram a eficácia comparativa do AG com dois novos copolímeros, FYAKE e VWAKE, desenhados para optimizarem a ligação à molécula de MHC. Em ambos os casos, os novos copolímeros foram mais eficazes na prevenção e tratamento da EAE neste modelo, e reduziram o número de lesões desmielinizantes no SNC; enquanto que o VWAKE demonstrou uma capacidade inibitória marcada sobre a proliferação de linfócitos T anti-MBP85-99, o FYAKE levou à produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (167). Os mesmos copolímeros foram também testados no modelo de

EAE crónica em ratinhos SJL/J, com idênticos resultados (168). Outras estratégias de desenho de péptidos artificiais com base nos motivos estruturais de ligação ao HLA-DR2 foram também empregues. Por exemplo, FRIDKIS-HARELI *et al.* desenharam vários polipeptidos de sequência definida, contendo 15 resíduos amino-acídicos cuja selecção foi baseada nos motivos de ligação ao HLA-DR2 para a MBP85-99 e AG: E em P-2, K em P-1, Y e A em P-1, e A em P2-P11. Após a sua capacidade de competição com a MBP85-99 ou o AG para a ligação ao MHC ter sido testada (169) STERN *et al.*, mais tarde, utilizaram três destas sequências em estudos experimentais de prevenção e tratamento da EAE. Nos dois modelos animais de EAE em ratinhos SJL/J (induzidos com PLP139-151) e “humanizados” (induzidos com MBP85-99), estes péptidos demonstraram idêntica eficácia terapêutica comparativamente com os copolímeros acima descritos. Mais importante, no entanto, é a constatação de que uma pequena sequência polipeptídica ordenada, baseada no motivo de ligação ao MHC, poderia ter a mesma capacidade imunomoduladora que uma longa sequência polimérica aleatória. De facto, a actividade biológica do AG diminui consideravelmente para polímeros de 35 aminoácidos, e polímeros de 15 aminoácidos são inactivos; o método aleatório de produção do AG – tendo a vantagem potencial de gerar cadeias com motivos de ligação mais universais – resulta provavelmente na geração de apenas um motivo de ligação para cada 50 aminoácidos. Do ponto de vista farmacológico, como tal, a produção de uma sequência bem definida seria muito mais eficaz.

Uma outra estratégia de desenho de sequências ordenadas foi desenvolvida por Pedro RUIZ e Lawrence STEINMAN, num trabalho no qual colaborámos; com base no mesmo motivo de ligação da MBP ao complexo MHC-TCR, sobretudo a presença de uma lisina (Lys91) como principal resíduo-contato com o TCR, e uma fenilalanina (Phe90) como principal resíduo-âncora, desenhámos sequências polipeptídicas ordenadas, compostas de grupos repetitivos de quatro aminoácidos, e testámos a sua eficácia no modelo de EAE aguda no rato Lewis. Dos vários péptidos testados, a sequência EYYKEYYKEYYK demonstrou ser capaz de competir

com a MBP85-99 para a ligação ao MHC, e foi eficaz na prevenção e tratamento da EAE (170). A comparação, feita através de modelização por computador, entre a ligação da MBP85-99 (His90Phe91Phe92Lys93) e o péptido EYYK (Glu90Tyr91Tyr92Lys93) à molécula de MHC do rato, revelou que a mudança Phe92→Tyr92 resulta numa ligação mais forte ao MHC, donde a sua capacidade de competição, enquanto a mudança His90→Glu90 poderá causar repulsão do TCR por aumento da carga electrostática (170).

Como se depreende do que acima ficou dito, a utilização de copolímeros aleatórios tem dado lugar ao desenvolvimento de sequências polipeptídicas definidas, desenhadas de forma a potenciar a interacção com as moléculas componentes do complexo trimolecular, e, dessa forma, aumentar a sua eficácia terapêutica. No entanto, copolímeros aleatórios como o AG poderão eventualmente, revelar algumas vantagens, nomeadamente pelo facto de não estarem limitados a um único complexo trimolecular. Na prática, dada a diversidade genética da espécie humana, com a enorme variabilidade nos genes HLA existente na população, a especificidade poderá não ser a melhor estratégia terapêutica, e, nesse caso, os copolímeros aleatórios teriam vantagem.

5. Modificação de antígenos com efeitos imunomoduladores: ligandos peptídeos alterados. Desenvolvimento na EAE e ensaios clínicos na EM.

Qualquer reacção imune mediada por células T depende do reconhecimento antigénico de sequências polipeptídicas de 8 a 20 aminoácidos ligadas a uma molécula de MHC classe II. Apesar de ser muito específica, existe bastante flexibilidade neste reconhecimento antigénico (lembremos a discussão sobre degenerescência de reconhecimento no capítulo anterior), e um mesmo TCR tem capacidade de interacção com vários ligandos diferentes; o reconhecimento destes ligandos alterados tem consequências dramáticas sobre a activação e funcionamento da célula T,

levando, entre outros, a estados de anergia e deleção por sobreactivação, ou ao seu enviesamento fenotípico. Dessa forma, os linfócitos T não têm apenas um funcionamento binário *on-off*, sendo capazes de responder diferencialmente a uma série de ligandos de afinidades variáveis (171, 172). Esta capacidade de reconhecimento flexível associada à activação diferencial foi primeiro reconhecida por EVAVOLD, SLOAN-LANCASTER e ALLEN em linhas linfocitárias Th2 que produziam IL-4 e proliferavam em resposta ao seu ligando natural, mas que só produziam IL-4 em resposta a um ligando modificado, e em linhas Th1 nas quais um ligando alterado era capaz não só de não estimular proliferação ou produção de citocinas, mas de induzir anergia clonal (173-175). Dentro de cada antigénio cognato existem várias estratégias para avaliar a importância do aminoácido presente em cada posição, tais como a substituição de cada resíduo pela alanina (que sendo o mais pequeno resíduo, é não-reactivo e elimina a função daquela posição no antigénio), mutagénese direccionada, colecções de péptidos com sequência sobreposta, e estudos estruturais tridimensionais por cristalografia de difracção de raios X (conforme descrito no capítulo anterior) (176). Dessa forma, é possível definir resíduos cuja substituição elimina totalmente a activação do TCR (contactos primários) e outros que cuja substituição apenas a modifica (contactos secundários) (172). As modificações introduzidas na sequência peptídica do antigénio podem resultar em estados de activação parcial, capazes de alterar a sinalização através do TCR e, dessa forma, induzir respostas fisiológicas diferentes; consoante a sua afinidade, os ligandos podem ser agonistas ideais (activação de todas as funções da célula T), agonistas fracos (necessitam de concentrações mais elevadas para induzir o efeito total), agonistas parciais (induzem activação parcial) e antagonistas. Existe uma hierarquia da activação das funções celulares, segundo a qual em linfócitos T totalmente diferenciados, cada função é activada sequencialmente, dependendo da força do estímulo do TCR; funções mais simples, como a citotoxicidade ou a secreção de citocinas, necessitam apenas de um estímulo parcial, enquanto

que a proliferação só acontece com a estimulação providenciada por um agonista total (176, 177).

Dentro dos agonistas parciais, ligandos obtidos por modificação parcial da sequência amino-ácida, denominados ligandos peptídeos alterados (LPA), exibem essa capacidade de modificação fenotípica da função linfocitária, com implicações no tratamento de doenças mediadas pela resposta celular, como a EAE ou a EM (171). Os LPA têm sido muito eficazes no tratamento de vários modelos experimentais de doença autoimune, incluindo a EAE; naturalmente, dependendo da espécie e estirpe de animal experimental utilizado na EAE, houve necessidade de criar LPA específicos para o antígeno imunodominante, tais como a AcMBP1-11, MBP85-99 ou PLP139-151 (revisto em (176)). Em relação ao encefalitogénio AcMBP1-11, os estudos iniciais do grupo de Lawrence STEINMAN revelaram que duas sequências peptídicas não patogénicas (MBP1-20 não acetilado e MBP9-20 acetilado) competiam com a sequência nativa para a ligação ao MHC e eram eficazes na prevenção da EAE (178). Na mesma altura, a análise estrutural das interações do TCR e MHC H-2u com a AcMBP1-9 permitiu definir os resíduos-contato chave para o TCR, e desenhar péptidos não-estimuladores (179). Estes resultados permitiram o desenho de vários ligandos alterados pela substituição de um único resíduo amino-ácido, com capacidades diferentes de estimulação do TCR e indução ou prevenção da EAE (180, 181). Algumas modificações resultaram em aumento de afinidade e maior capacidade estimuladora, enquanto outras tiveram o efeito inverso. Particularmente interessantes foram as modificações na quarta posição da AcMBP1-11 (lisina); a substituição deste resíduo por uma alanina (AcMBP1-11 [4A]) resultou num LPA com aumento dramático da afinidade pelo MHC, bem como na sua capacidade de estimuladora *in vitro* de células T encefalitogénicas, embora fosse pouco imunogénico por si mesmo. Quando usado antes da indução, ou imediatamente antes do aparecimento de sinais clínicos de doença, a AcMBP1-11[4A] foi eficaz na prevenção da EAE, embora o seu mecanismo de acção não fosse claro (sem relação com a competição pelo TCR ou a

geração de células reguladoras) (181). Mais tarde, utilizando um modelo de EAE em ratinhos transgênicos para o TCR anti-AcMBP1-11 restrito a H-2u, PEARSON, EWIJK e MCDEVITT testaram os LPA AcMBP1-11[4A] e AcMBP1-11[4Y], cuja afinidade é muito superior à do antígeno nativo. A utilização destes LPA resultou em apoptose generalizada dos linfócitos auto-reactivos, e no enviesamento Th2 dos sobreviventes, mecanismos de acção relevantes para explicar a eficácia destas moléculas na prevenção e tratamento da EAE (182).

O desenvolvimento de LPA para o encefalitogénio PLP139-151 partiu do reconhecimento da importância do triptofano na posição 144 (W144) como contacto principal, e da histidina (H147) e leucina (L141) como contactos secundários. A substituição do triptofano por uma glutamina (144 W>Q) resultou num LPA (Q144) com capacidade de protecção da EAE induzida pelo péptido nativo através da geração de linfócitos T anti-Q144 com reactividade cruzada com o antígeno nativo, fenótipo Th2 e capacidade de transferência adoptiva de protecção (183). Estudos com outro LPA da PLP139-151, denominado LR (com as modificações 144 W>L e 147 H>R), com idênticas capacidades protectoras (184), revelaram outros mecanismos de acção. Por exemplo, a utilização deste LPA resultou na geração de uma população de células reguladoras, com fenótipo Th2 e reactividade cruzada com a PLP139-151 (185), que se pensa estarem presentes no SNC dos animais tratados (184); estas células têm capacidade de induzir *bystander suppression* quando co-cultivadas com esplenócitos encefalitogénicos anti-PLP139-151 através da secreção de IL-4, IL-10, IL-13 e TGFβ (186). Por último, o tratamento com LR resultou numa modulação da expressão de quimiocinas e seus receptores, com uma diminuição de todas as quimiocinas, e da maioria dos seus receptores na medula espinal; apenas os receptores CCR3 e CCR4 foram encontrados, estando estes associados à resposta Th2 (187). A utilização de LPA pode também, paradoxalmente, gerar respostas inflamatórias potencialmente deletérias; a substituição 144W>L produz um LPA superagonista com capacidade de estimulação da proliferação e produção de citocinas muito superior à do antígeno nativo ou do Q144 (188);

a imunização com o LPA LR também evidenciou capacidade de indução de EAE em 1% dos animais, provavelmente por estimulação cruzada de linfócitos T encefalitogénicos (184).

A importância da sequência MBP84-102 como antigénio nos doentes com EM, e da correspondente MBP87-99 na EAE levou, naturalmente, a que houvesse grande interesse no desenvolvimento de LPA para este epítipo. Com base neste pressuposto, e no esclarecimento progressivo das relações estruturais entre este antigénio e a molécula HLA-DR2, KARIN e STEINMAN procederam à descoberta dos resíduos-contato chave para o TCR através de substituições pontuais por alanina; desta forma, identificaram-se os resíduos Lys91, Thr95 e Pro96 como essenciais para a capacidade encefalitogénica (189). A modificação MBP87-99[91K>A] resultou num LPA com capacidade de prevenção e tratamento da EAE em ratos Lewis, e redução na produção de IFN γ e TNF por parte dos linfócitos T anti-MBP (189). Para além da demonstração da capacidade de modificação fenotípica por parte dos LPA, esta foi a primeira situação em que um LPA actuou de forma terapêutica em doença já estabelecida. Uma vez que durante o curso da doença existiriam linfócitos T já totalmente diferenciados, o efeito terapêutico poderia ser devido quer ao efeito de *bystander suppression* de células naive diferenciadas sob influência do LPA, quer à influência deste fármaco sobre as células diferenciadas. A capacidade de um LPA de actuar sobre células já diferenciadas é ainda incerta; no entanto, presume-se que o efeito de agonista parcial possa estimular algumas funções efectoras mesmo na ausência da activação total da célula, impedindo assim a sua capacidade encefalitogénica (176). A ratificação dessa capacidade moduladora pós-diferenciação veio de um trabalho de WINDHAGEN *et al.*, que, utilizando um clone linfocitário T anti-MBP85-99 humano, confirmaram que a estimulação com a sequência MBP85-99[90H>A] resulta numa modificação de um fenótipo Th0 (após estimulação com o antigénio nativo) para Th2, com indução da síntese e secreção de TGF- β 1, presumivelmente por alterar a sinalização do TCR através da p56^{lck} (190). Mais tarde, BROCKE *et al.* confirmaram a existência de *bystander*

suppression num modelo de EAE em ratinhos (PL/JxSJL)F1; neste modelo, a doença pode ser induzida com clones anti-AcMBP1-11 ou anti-MBP87-99, dada a existência de dois haplotipos H-2 (I-A^u e I-A^s). O LPA MBP87-99[96P>A] tem capacidade de prevenção e tratamento da doença induzida por transferência com clones anti-MBP87-99, com uma redução significativa dos infiltrados inflamatórios presentes localmente no SNC, dependente da secreção de IL-4 (191). Após transferência de clones anti-AcMBP1-11, o LPA não tem qualquer efeito terapêutico sobre a EAE obtida; no entanto, se forem transferidos, concomitantemente, clones anti-MBP87-99, a eficácia do fármaco na supressão da doença é restituída (191). A interpretação deste fenómeno é que a acção da MBP87-99[96P>A] sobre o clone anti-MBP87-99 resulta numa modificação benéfica do seu fenótipo, e.g. secreção de IL-4, capaz de influenciar indirectamente as capacidades efectoras do outro clone encefalitogénico de especificidade antigénica diferente. A existência de *bystander suppression* no SNC significa que o tratamento com LPA poderia ser benéfico mesmo na presença de uma resposta imune anti-mielina diversificada, contra vários antígenos da mielina para além do alvo específico da terapêutica, ou seja, as circunstâncias que cremos existir na placa desmielinizante.

Tendo como base estes dados experimentais, ensaios clínicos de LPA dirigidos ao antígeno MBP85-99 foram iniciados no final dos anos noventa. A selecção deste antígeno foi fundamentada nos numerosos trabalhos que confirmam a sua importância na imunopatogénese da EM, incluindo a existência de respostas linfocitárias T e B, a demonstração da sua associação ao HLA-DR2 e apresentação local nas placas desmielinizantes (revisto nos capítulos anteriores). Os estudos de ligação estrutural às moléculas DR2, bem como de determinação dos resíduos-contato chave, revelaram a importância fundamental da Phe89 e Lys91 na estimulação do TCR. Como tal, um LPA com a adição de dois resíduos amino-acídicos no N-terminal (de maneira a prolongar a semi-vida do fármaco), e no qual estes dois resíduos foram alterados para prevenir a estimulação total dos linfócitos T encefalitogénicos foi desenhado (MBP85-99 [89F>L; 91K>A]; ou D-Ala83-

Lys84-Leu89-Ala91 MBP83-99). No ensaio clínico de fase I do NBI-5788 (Neurocrine Biosciences Inc.), realizado em 11 doentes com EM, que receberam quatro doses de LPA (5, 10 ou 20 mg de fármaco/semana por via subcutânea durante 1 mês), não houve efeitos adversos significativos, e uma tendência para melhoria da RMN. Foi detectada uma elevada frequência de precursores T anti-MBP85-99 e anti-LPA, e com reactividade cruzada entre os dois, que num dos doentes persistiu vários meses após a cessação do ensaio; na sua maioria, estas células tinham um fenótipo Th2 (192). Após este ensaio inicial, dois estudos de fase II foram realizados, e a publicação simultânea dos seus resultados contraditórios foi feita em 2000; em ambos os casos, os estudos foram parados prematuramente pelo aparecimento de efeitos adversos inesperados (revisto em (40, 41, 176)). Num ensaio multicêntrico, duplamente cego, controlado por placebo, desenhado para incluir 144 doentes de sete países, três doses de NBI-5788 foram testadas (5, 20 e 50 mg/semana, s.c., durante 4 meses). Infelizmente, este ensaio foi parado a meio pelo aparecimento de reacções de hipersensibilidade (urticária, exantemas, parestesias, dispneia), em 9% dos doentes nas dosagens mais elevadas (193). Embora não houvesse influência nas medidas de eficácia clínica (taxa de surtos, EDSS), a análise da RMN nos doentes que completaram o ensaio revelou uma redução de actividade nas baixas dosagens; não ocorreram surtos clínicos ou imagiológicos relacionáveis com o tratamento (193). Os estudos imunológicos *in vitro* confirmaram a existência de linfócitos T anti-APL de fenótipo Th2, com reactividade cruzada com a MBP, e de anticorpos IgG1 anti-LPA (193). No outro ensaio clínico, de menores dimensões, controlado por RMN e num único centro, 8 doentes com EM foram tratados com a dosagem mais elevada de LPA (50 mg); o ensaio foi eventualmente terminado pelo aparecimento de surtos, relacionados com a terapia, em 3 destes doentes (194). Considerando o grupo como um todo, não houve qualquer modificação nos parâmetros clínicos ou imagiológicos antes e depois do tratamento. Foi observada uma expansão significativa da população de linfócitos T anti-LPA com reactividade cruzada contra a MBP, sobretudo com fenótipo Th1. Durante o ensaio, três doentes desenvolveram

sinais clínicos e imagiológicos de surto desmielinizante agudo, com características atípicas: num doente apareceram 79 novas lesões com captação de contraste à quinta semana de tratamento, conjuntamente com um aumento desproporcional de reactividade anti-LPA e anti-MBP (aumento superior a 1000 vezes o estado basal); noutro doente, surgiu uma lesão pseudotumoral ao quinto mês de terapia, após 3 anos sem qualquer nova lesão em RMN de controlo; por último, o terceiro doente desenvolveu uma paraparésia flácida causada por envolvimento do sistema nervoso periférico de características inflamatórias (176, 194).

No seu conjunto, estes dois ensaios demonstraram que os LPA têm efeitos biológicos reais no ser humano, são imunogénicos, e têm propriedades imunomoduladoras por vezes geradoras de efeitos fenotípicos benéficos; nas dosagens mais elevadas, no entanto, podem ocorrer efeitos deletérios paradoxais, tais como a hipersensibilidade ou o desenvolvimento de fenótipos imunes prejudiciais. Vários factores podem contribuir para esta dualidade de efeitos. Por exemplo, o facto de que nem todas as linhas celulares anti-MBP83-99 partilharem os mesmos resíduos-chave na estimulação do TCR, sendo que, nesse caso, outras regiões do LPA possam actuar como o antigénio nativo. Segundo, as modificações no LPA podem resultar em novos padrões de ligação a outras moléculas de MHC; desse modo, o novo complexo Ag-MHC poderia ser estimular populações linfocitárias novas, que não tivessem sido eliminadas no timo. Por último, apesar de o LPA ser um agonista parcial, doses muito elevadas podem estimular linfócitos T auto-reactivos de elevada afinidade para o antigénio nativo – denominada resposta T heteroclítica – resultado assim na sua expansão e activação do seu fenótipo encefalitogénico (revisto em (176)). Dados os resultados promissores nas dosagens mais baixas, um ensaio clínico fase IIb foi realizado, utilizando a dosagem de 5 mg mensalmente; em Março deste ano, o ensaio foi terminado por falta de eficácia clínica (195). Aguardamos ainda a publicação dos resultados deste estudo, e somente nessa altura será possível tirar conclusões fidedignas; com base no que acima ficou dito, no entanto, provavelmente a redução muito substancial da

dosagem de LPA utilizada (de 5 a 20 mg semanal, para 5 mg mensal) teve como consequência a perda dos efeitos benéficos do fármaco, a par com o desaparecimento das suas complicações.

6. Vacinação com ADN codificador de proteínas de mielina: imunomodulação para além das proteínas e péptidos. Construção, produção, mecanismos de acção e aplicações das vacinas de ADN. Utilização em modelos experimentais de autoimunidade.

Todas as formas de imunomodulação até agora revistas neste trabalho são variações e melhoramentos sobre o mesmo conceito terapêutico, introduzido por FERRARO e CAZZULLO: que a administração de antígenos do próprio tem capacidade de influenciar o curso das doenças autoimunes contra elas provocadas. No que respeita à EAE e, por inferência, à EM, encontram-se na mielina os alvos antigénicos relevantes; progressivamente, evoluiu-se da administração desta substância por inteiro, para os seus componentes proteicos e, finalmente, dos seus epítomos antigénicos. A compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular destes antígenos possibilitou o desenho de formas cada vez mais direccionadas de terapia, como os LPA nos quais são modificados apenas os aminoácidos responsáveis por estimular o receptor do linfócito auto-reactivo. O passo seguinte consistiu no desenvolvimento de formas de imunomodulação baseadas em antígenos não dependentes do isolamento ou síntese artificial, onerosa e difícil, de proteínas ou ligandos peptídeos. A vacinação com ADN, inicialmente criada como forma de imunoterapia específica contra infecções e tumores, desenvolveu-se, nos últimos 10 anos, como terapia antígeno-específica para a prevenção e tratamento de vários modelos animais de doença autoimune, encontra-se actualmente em ensaios clínicos na Esclerose Múltipla, e é o fulcro do nosso trabalho aqui apresentado. Iremos, de seguida, apresentar brevemente as bases teóricas desta nova tecnologia, e tecer breves considerações sobre as suas potencialidades e mecanismos de acção (revistos em (196-208).

A utilização de ADN purificado como agente terapêutico tornou-se possível a partir do momento em que WOLFF *et al.*, em 1990, provaram que a transferência de plasmídeos bacterianos directamente para células musculares por simples injeção resultava em que o gene codificado nessa sequência de ADN fosse transcrito e expresso de forma constitutiva até 2 meses após uma única injeção (209). Inicialmente a vacinação com ADN foi encarada como uma forma conveniente de fazer terapia de substituição génica (*gene therapy*) sem os problemas técnicos associados a outros modos de transferência de material genético. Pouco tempo depois, foi demonstrada a capacidade de gerar uma resposta imune contra os produtos codificados no plasmídeo injectado. Num modelo animal de infecção, ratinhos imunizados com uma vacina de ADN codificadora de uma proteína do vírus da influenza desenvolveram imunidade protectora consistindo de anticorpos específicos e uma resposta T citotóxica (210). Já tinha sido previamente relatado que a injeção subcutânea de partículas de ouro coloidal cobertas com o ADN codificador da hormona de crescimento e α 1-antitripsina humana gerava uma resposta humoral específica em animais experimentais (211).

Estes factos levaram rapidamente ao conceito de utilizar plasmídeos “nús” (i.e. purificados, sem estarem incluídos em qualquer agente transportador, como um vírus ou uma bactéria) como vacinas anti-infecciosas (revisto em (197, 202, 203)). À natureza contra-intuitiva desta descoberta, dada a existência de numerosas enzimas capazes de degradar ácidos nucleicos livres, juntou-se a constatação de que o ADN era uma substância imunologicamente reactiva, capaz de gerar, só por si, fortes reacções imunes, sobretudo à custa da activação do sistema imune inato (revisto em (212-216)). De facto, o ADN bacteriano pertence ao grupo dos *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP), um conjunto de padrões moleculares pertencentes a agentes microbianos que actuam como sinais de alarme para o Sistema Imune, através dos receptores *Toll-like* (TLR) (217). As sequências CpG não-metiladas (Citosina-fosfato-Guanina, precedida de duas purinas e seguida de duas pirimidinas), presentes na cadeia de ADN, são capazes de activar várias células do Sistema Imune tais como as células

dendríticas, monócitos, macrófagos, e linfócitos T e B através do receptor TLR9 (218-221). Estas sequências são cerca de 80 vezes mais abundantes no ADN bacteriano e viral, estando normalmente metiladas no ADN de mamífero (revisto em (216)). No seu conjunto, estas duas descobertas significaram que não só era possível gerar uma resposta imune contra um antígeno codificado numa molécula de ADN, como esta mesma molécula fornecia os adjuvantes necessários para potenciar a dita resposta.

As vacinas de ADN têm numerosas vantagens em comparação com vacinas convencionais, entre as quais a facilidade de elaboração de vacinas contra qualquer agente microbiano desde que a sequência do seu material genético seja conhecida, a simplicidade da sua construção, produção e modificação, a capacidade de manipular vacinas para incluir vários antígenos no mesmo constructo, inclusive de diferentes agentes infecciosos, a geração de uma boa resposta imune celular e humoral (enquanto que as vacinas convencionais geram sobretudo anticorpos), e ainda a possibilidade de co-vacinar com outros genes imunomoduladores (citocinas, moléculas co-estimuladoras) de forma a potenciar a resposta imune gerada (197, 205). Mais ainda, enquanto que as propriedades imunogénicas de antígenos proteicos, dependentes da sua estrutura tridimensional, podem ser alteradas no processo convencional de produção de vacinas, na vacinação com ADN a estrutura tridimensional e, conseqüentemente a imunogenicidade do antígeno-alvo serão determinadas apenas pelo processo de transcrição da sequência de ADN, dependentes dos mecanismos normais de síntese proteica. Não há, igualmente, os riscos associados a vacinas com agentes atenuados, tais como a possibilidade reversão da patogenicidade por mutação espontânea, ou combinação com outros agentes infecciosos (205).

As necessidades básicas para a construção de uma vacina de ADN são a clonagem e inclusão da sequência de interesse (codificadora do antígeno pretendido) num vector de expressão genético; os vectores tipicamente utilizados são plasmídeos bacterianos desenhados para otimizar a expressão do seu produto em células de mamífero (Figura 3). Na sua sequência de ADN circular, os vectores incluem normalmente um promotor

de expressão específico para células de mamífero (e.g. CMV, SV40), um gene de resistência antibiótica para fins de selecção *in vitro* durante o processo de clonagem, e uma cauda poli-A destinada a estabilizar o ARN mensageiro traduzido a partir do fragmento codificador (198). Este fragmento, por sua vez, está normalmente flanqueado na sua extremidade 5', por uma sequência de iniciação de transcrição (sequência de consenso KOZAK (222, 223)), possui um codão de iniciação e um de terminação de transcrição. Sequências de reconhecimento para digestão por enzimas de restrição são normalmente incluídas no vector, de maneira a facilitar a clonagem e sequenciação do constructo (Figura 3). Dependendo da sequência do vector utilizado, existe um número variável de sequências CpG, o que tem influência na sua imunogenicidade e capacidade imunoestimuladora.

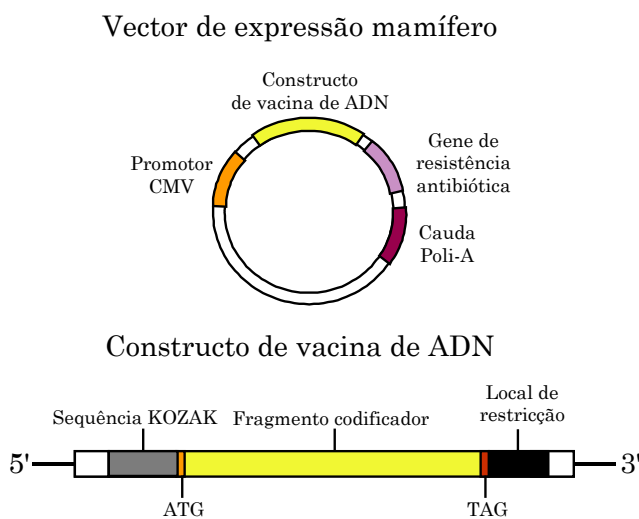


Figura 3. Esquema típico de vacina de ADN. O vector plasmídeo contém, tipicamente, para além da sequência do constructo vacinal, uma sequência promotora para células mamíferas, um gene de resistência antibiótica para selecção durante a clonagem, e uma cauda poli-A que transforma o constructo num ARN mensageiro. O constructo utilizado numa vacina de ADN é composto de uma sequência codificadora do antígeno flanqueada por codões de início e terminação de transcrição (ATG e TAG, respectivamente), bem como uma sequência KOZAK que indica ao ribossoma onde começar o processo de transcrição do ARN.

A produção em massa e purificação de vacinas de ADN implica apenas a capacidade de manipulação de técnicas básicas de biologia molecular, tais como a clonagem da sequência de interesse por reacção de polimerização em cadeia e sua inserção no vector de expressão escolhido, transfecção de linhas bacterianas apropriadas, e crescimento em massa por cultura em meio enriquecido, após o qual a extracção é feita por lise bacteriana e purificação química do ADN plasmídeo (Figura 4). Em consequência disso, torna-se muito simples proceder à modificação de uma

vacina, para incluir uma sequência diferente, ou para modificar a existente; qualquer alteração da vacina implica somente a re-clonagem da sequência de interesse, ou a inserção de um oligonucleótido artificialmente sintetizado, sendo o restante processo idêntico, independentemente do antígeno-alvo.

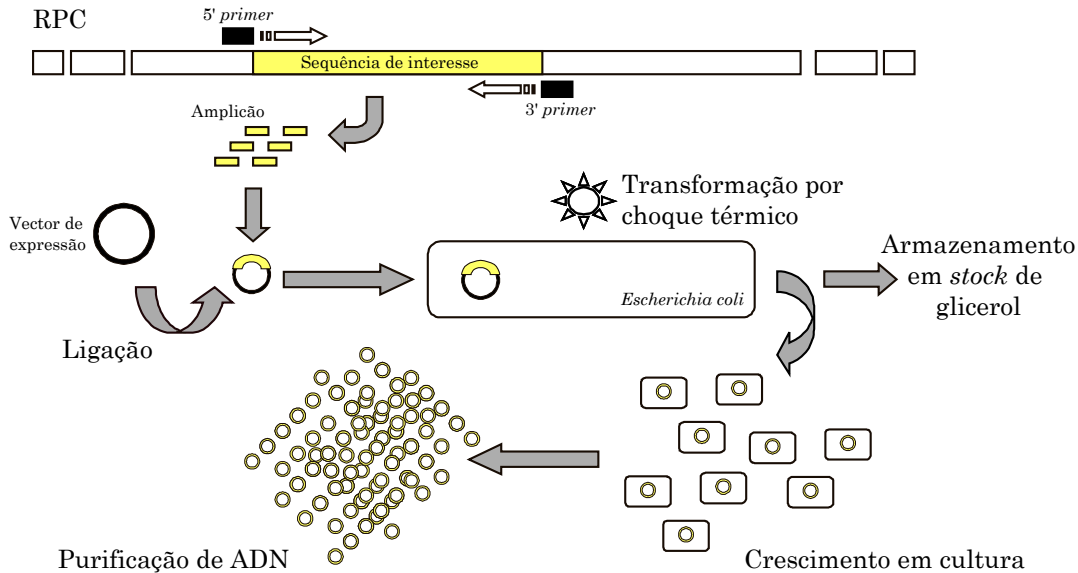


Figura 4. Esquema de clonagem e produção em massa de uma vacina de ADN. Após o passo inicial de clonagem por RPC da sequência de interesse (gene, sequência parcial de gene, combinação de sequências), procede-se à sua ligação a um vetor de expressão plasmídico e estabelecimento de uma linha bacteriana estável para produção em massa. Durante a produção, estimula-se o crescimento em grandes volumes de meio de cultura otimizado para a maximização do crescimento bacteriano, seguido de extracção do ADN por processos químicos.

Uma vez administrada, a vacina de ADN gera uma reacção imune de tipo celular e humoral, após apresentação do antígeno que codifica no contexto de moléculas do MHC classe I e II. Dada a sua natureza, os antígenos codificados no plasmídeo são processados por via endógena e facilmente acessíveis para serem apresentados no contexto de moléculas de classe I; a apresentação em classe II necessita de mecanismos de *cross-presentation* (i.e. passagem da via endógena para a exógena durante o processamento intracelular do antígeno) ou, em alternativa, o antígeno poderá ser produzido em células somáticas e depois fagocitado pelas APC, ou

após secreção do antígeno, ou depois da morte da célula transfectada (202). Consideram-se três mecanismos principais de apresentação de antígeno a partir de uma vacina de ADN: apresentação por células somáticas, apresentação por APC profissionais, e *cross-priming* (7-9). Na primeira destas modalidades, e no caso da administração intramuscular de vacina, seria a própria célula muscular a processar o antígeno e apresentá-lo a um linfócito T. Este mecanismo poderia explicar a geração de uma resposta citotóxica no contexto de MHC-I, mas dado que poucas células têm capacidade de apresentar moléculas em MHC-II com os co-estímulos apropriados, dificilmente explicaria a geração de uma resposta T_{helper} (Th) ou a produção de anticorpos. Como tal, ou por transfecção directa de APC profissionais, ou por *cross-priming* destas células, processo no qual o antígeno é sintetizado em células somáticas e depois transferido para APC, as principais responsáveis pela geração de uma reacção imune eficaz são provavelmente células dendríticas, pertencentes ao sistema imune inato (205, 213) (Figura 5). Após vacinação com ADN, conseguem-se habitualmente respostas imunes diversificadas, com geração de respostas T e B imediatas e estabelecimento de memória imunológica (205).

As vacinas de ADN podem ser administradas por via intramuscular, intradérmica, subcutânea, intralinfática, intraesplénica e intrahepática, entre outras (203, 205). Consoante cada uma destas vias é utilizada, podem ser obtidas respostas imunes de características diferentes. A forma mais frequentemente utilizada é a injeção intramuscular da vacina, após indução de inflamação e regeneração do músculo pretendido através de injeção prévia com cardiotoxina, ou com anestésicos locais como a bupivacaína, o que melhora a sua eficácia (224). Este tipo de vacinação gera predominantemente respostas linfocitárias Th1. Outras modalidades de administração, como a intradérmica, têm sido estudadas sobretudo na tentativa de obter respostas humorais mais potentes, e um enviesamento fenotípico Th2. A administração através das mucosas (naso-traqueal, intestinal, genital) tem sido empregues na tentativa de induzir imunidade protectora local, e também no tratamento de alergias (revisto em (205)).

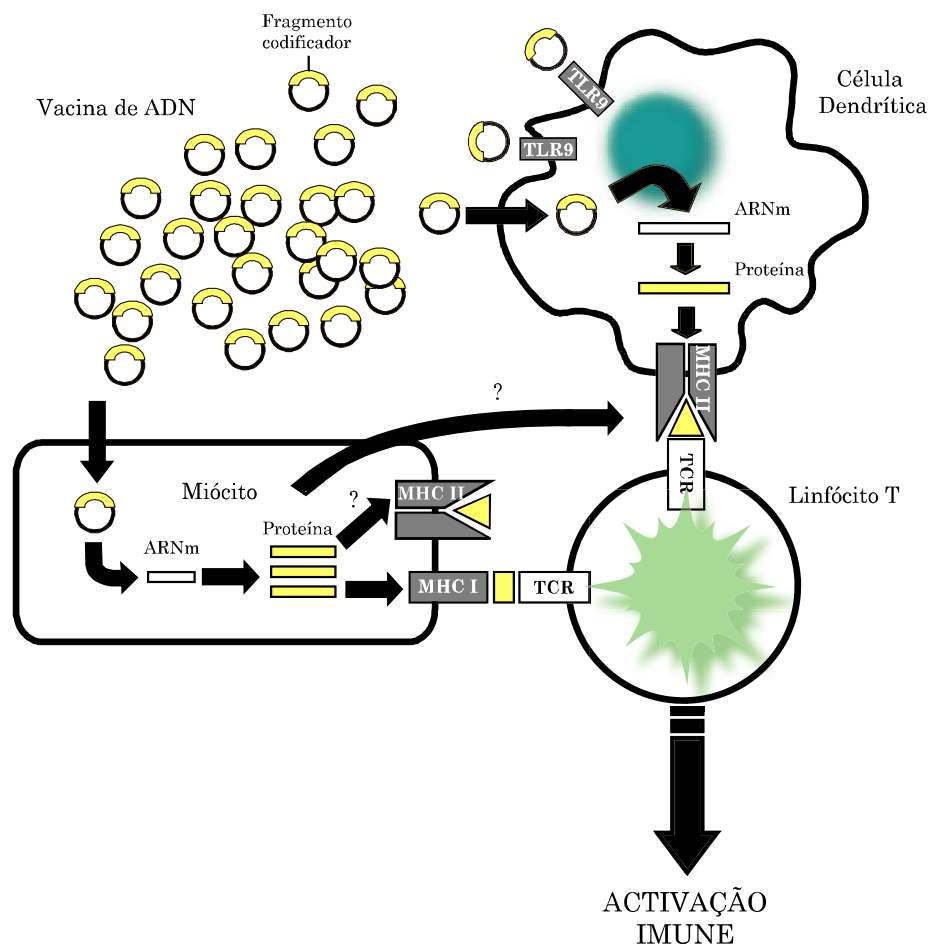


Figura 5. Mecanismos de acção das vacinas de ADN. Após administração, as vacinas de ADN estimulam uma resposta imune por vários mecanismos. A presença de motivos CpG no esqueleto do plasmídeo vector actua como adjuvante endógeno sobre o receptor TLR9 presente nas células apresentadoras de antígeno. Após captação por células com capacidade de apresentação antagénica (miócitos, células dendríticas), o constructo antagénico é transcrito em proteína e apresentado no contexto de moléculas do MHC classe I e II a linfócitos T, resultando na sua activação. A apresentação antagénica pode ser feita directamente por células musculares ou células apresentadoras de antígeno profissionais (e.g. células dendríticas), ou por *cross-priming*, processo no qual a síntese do antígeno é feita nas células musculares, seguida de transferência do antígeno para a célula apresentadora. MHC – *major histocompatibility complex*; TCR – *T cell receptor*; TLR9 – *Toll-like receptor 9*; ARNm – ARN mensageiro.

A maior parte do ADN administrado intramuscularmente é degradado pelas deoxiribonucleases extracelulares presentes localmente, pelo que se tornou necessário desenvolver técnicas de administração com agente portador. Entre estas, destacam-se a *gene gun*, liposomas, cocleatos

de cálcio, encapsulamento em micropartículas poliméricas, administração em organismos atenuados e imunização com transgenes somáticos (revisto em (205)). A mais bem conhecida destas técnicas é a *gene gun*, que consiste num mecanismo que dispara partículas microscópicas de ouro coloidal às quais estão quimicamente agregadas as moléculas de ADN plasmídeo. As vantagens desta abordagem são a necessidade de quantidades 100 a 1000 vezes menores de ADN para obter o mesmo efeito biológico, e a geração de respostas Th2, uma vez que os projecteis não atravessam a derme.

Estratégias de vacinação com ADN têm sido aplicadas em diversos contextos clínicos, na tentativa de induzir imunidade protectora contra agentes infecciosos e na imunoterapia de alguns tipos de cancro, como sejam linfomas e adenocarcinomas (197, 201-204, 225). Vários agentes bacterianos, virais e parasitários foram já alvos de vacinação com ADN, incluindo ensaios humanos de vacinas contra o vírus da imunodeficiência humana VIH (226, 227), hepatite B (228, 229), parasitas (230), malária (231, 232) e tuberculose (233-235). Os resultados preliminares destes ensaios revelaram que a vacinação isolada com ADN é pouco imunogénica, induzindo pouca protecção contra agentes infecciosos. Esta constatação levou ao desenvolvimento de estratégias de optimização da imunogenicidade com consequente aumento da eficácia, tais como a co-imunização com citocinas, administração de ADN com motivos imunoestimuladores, ou técnicas de *prime-boost* nas quais após a vacinação com ADN (*priming*), é dado um reforço (*boost*) que pode consistir numa proteína ou péptido do microorganismo-alvo, ou esse mesmo organismo inactivado (236-238).

A segurança da vacinação com ADN foi desde cedo considerada um tema importante, dados os antecedentes de efeitos adversos inesperados, e que levaram à interrupção nos poucos ensaios experimentais de terapia génica realizados. Existem, como tal, regras bem definidas para o desenvolvimento desta tecnologia para aplicação em humanos (239). Os perigos potenciais da utilização desta tecnologia são sobretudo os de integração da vacina de ADN no genoma celular (com consequente mutagenicidade), indução de tolerância levando à falha dos mecanismos

normais de controlo de infeções, e geração de autoimunidade pela indução de anticorpos anti-ADN de dupla cadeia (240). Os resultados até agora obtidos, nos ensaios experimentais em modelos animais e em todos os ensaios clínicos humanos realizados, demonstraram que a vacinação com ADN é segura, e não parece induzir nenhum efeito adverso observável. A integração do ADN da vacina no genoma celular, a ocorrer, é ordens de magnitude mais rara que a taxa de mutação espontânea do mesmo (241), e repetidos ensaios têm demonstrado que as vacinas com ADN não induzem nem aceleram o desenvolvimento de autoimunidade (242, 243).

De uma forma geral, o aparecimento das vacinas de ADN tem sido considerado como uma revolução na profilaxia das doenças infecciosas, abrindo perspectivas de desenvolvimento de vacinas contra agentes infecciosos até agora não susceptíveis aos processos clássicos de criação de vacinas, ou aperfeiçoando o arsenal já existente. No que diz respeito às doenças autoimunes, paradoxalmente, a utilização de vacinas de ADN tem surgido como uma forma de imunomodulação antigénio-específica, capaz de modificar de forma benéfica o curso clínico de vários modelos experimentais através da alteração do perfil da resposta imunitária, e potencialmente relevante para o tratamento destas doenças no ser humano. Nestes casos, administram-se vacinas codificando quer proteínas do próprio (*self*), quer outros componentes do sistema imune, tais como citocinas e quimiocinas (206). Dada a sua facilidade de manipulação laboratorial, e produção em massa, as vacinas de ADN são uma forma simples de administrar antigénios do *self*, contornando a necessidade de recorrer aos métodos morosos de purificação de proteínas e péptidos. Para além disso, no contexto da autoimunidade, as vacinas de ADN podem também ser utilizadas como forma de terapia génica local, induzindo a produção pelas células somáticas de moléculas imunomoduladoras, como citocinas, com efeitos regulatórios parácrinos (244).

A eficácia da vacinação com ADN foi já demonstrada em vários modelos animais de doença autoimune (206, 245, 246), incluindo a diabetes em ratinhos NOD (247-255), artrite adjuvante (256-263), miocardite

autoimune (264, 265) neuropatia autoimune experimental (265, 266), e na encefalomielite autoimune experimental (EAE), o modelo animal de Esclerose Múltipla; após a apresentação dos nossos resultados com esta terapia experimental, teremos a oportunidade de os comparar e comentar a literatura existente sobre o tema. Nestes vários modelos, as estratégias de vacinação têm variado: administração do autoantígeno responsável, como por exemplo a cadeia beta da insulina ou a molécula GAD65 ligada à porção Fc da IgG no caso da diabetes (250, 251) ou a proteína de choque térmico hsp60 na artrite adjuvante (259); quebra de tolerância contra quimioquinas C-C (258), ou contra a citocina pró-inflamatória TNF (257), através da produção de anticorpos neutralizantes contra estas moléculas; por último, a administração de sequências vazias de plasmídeo, ou mesmo somente de oligonucleótidos CpG foi utilizada para modular a resposta imune de forma inespecífica no modelo de diabetes (248). No seu conjunto, estes trabalhos demonstraram a capacidade da vacinação com ADN influir de forma benéfica em doenças autoimunes. De entre os vários mecanismos aos quais é atribuível esta eficácia, dois tipos de efeitos genéricos podem ser distinguidos: a modulação da resposta imune antígeno-específica, na qual a sequência codificada na vacina é a correspondente ao autoantígeno implicado na patogénese da doença; ou a indução de efeitos não antígeno-específicos, como sejam o bloquear da acção de quimiocinas, ou mesmo apenas a modificação da actividade do sistema imune inato através dos efeitos moduladores dos motivos CpG presentes no esqueleto do vector plasmídeo.

Terminamos aqui a primeira parte do nosso trabalho, ao longo da qual tentámos descrever, brevemente, o paradigma da Esclerose Múltipla como doença imuno-mediada, e o modelo-padrão actualmente aceite para explicar a sua fisiopatologia; a forma como esse modelo evoluiu desde a descoberta da doença, com o desenvolvimento do modelo experimental que levou à descoberta dos seus mecanismos etiopatogénicos, incluindo a existência de uma resposta autoimune contra componentes da mielina do SNC; por último, tendo por base este paradigma imunopatológico, o

desenvolvimento de terapêuticas antigénio-específicas, como a administração de mielina, o desenvolvimento de copolímeros e ligandos peptídeos alterados, e, finalmente, a vacinação com ADN.

Na parte experimental que se segue, descreveremos os resultados das nossas experiências sobre a utilização de vacinação com ADN codificador de proteínas de mielina como terapêutica antigénio-específica na EAE, bem como o trabalho que levou à descoberta de um novo alvo antigénico para estas terapias, nomeadamente a proteína inibidora do recrescimento axonal, Nogo-A.

7. Bibliografia.

1. Miller, D., J.H. Noseworthy, and A. Compston. 2006. Care of the person with Multiple Sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*. A. Compston, C. Confavreux, H. Lassmann, I. McDonald, D. Miller, J.H. Noseworthy, K. Smith, and H. Wekerle, editors. Churchill Livingstone Elsevier Inc.
2. Schapiro, R.T. 2005. Managing symptoms of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:177-187, vii.
3. O'Connor, P. 2006. Symptom management. *Adv Neurol* 98:227-255.
4. Rudick, R.A., J.A. Cohen, B. Weinstock-Guttman, R.P. Kinkel, and R.M. Ransohoff. 1997. Management of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 337:1604-1611.
5. Arnason, B.G. 1999. Immunologic therapy of multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 50:291-302.
6. Polman, C.H., and B.M. Uitdehaag. 2000. Drug treatment of multiple sclerosis. *Bmj* 321:490-494.
7. Bashir, K., and J.N. Whitaker. 2002. Current immunotherapy for demyelinating diseases. *Arch Neurol* 59:726-731.
8. Galetta, S.L., C. Markowitz, and A.G. Lee. 2002. Immunomodulatory agents for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a systematic review. *Arch Intern Med* 162:2161-2169.
9. Noseworthy, J.H. 2003. Management of multiple sclerosis: current trials and future options. *Curr Opin Neurol* 16:289-297.
10. Noseworthy, J.H. 2003. Treatment of multiple sclerosis and related disorders: what's new in the past 2 years? *Clin Neuropharmacol* 26:28-37.
11. Noseworthy, J.H., D. Miller, and A. Compston. 2006. Disease-modifying treatments in Multiple Sclerosis. In *McAlpine's Multiple Sclerosis*. A. Compston, C. Confavreux, H. Lassmann, I. McDonald, D. Miller, J.H. Noseworthy, K. Smith, and H. Wekerle, editors. Churchill Livingstone Elsevier Inc.
12. Kieseier, B.C., B. Hemmer, and H.P. Hartung. 2005. Multiple sclerosis--novel insights and new therapeutic strategies. *Curr Opin Neurol* 18:211-220.
13. Weinstock-Guttman, B., and L.D. Jacobs. 2000. What is new in the treatment of multiple sclerosis? *Drugs* 59:401-410.
14. Frohman, E.M., O. Stuve, E. Havrdova, J. Corboy, A. Achiron, R. Zivadinov, P.S. Sorensen, J.T. Phillips, B. Weinshenker, K. Hawker, H.P. Hartung, L. Steinman, S. Zamvil, B.A. Cree, S. Hauser, H. Weiner, M.K. Racke, and M. Filippi. 2005. Therapeutic considerations for disease progression in multiple sclerosis: evidence, experience, and future expectations. *Arch Neurol* 62:1519-1530.
15. Gauthier, S.A., G.J. Buckle, and H.L. Weiner. 2005. Immunosuppressive therapy for multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:247-272, viii-ix.
16. Atkins, H., and M. Freedman. 2005. Immunoablative therapy as a treatment aggressive multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:273-300, ix.
17. Neuhaus, O., B.C. Kieseier, and H.P. Hartung. 2006. Mitoxantrone in multiple sclerosis. *Adv Neurol* 98:293-302.
18. Kappos, L. 2005. Interferons in multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:189-214, vii-viii.
19. Rudick, R.A. 1999. Disease-modifying drugs for relapsing-remitting multiple sclerosis and future directions for multiple sclerosis therapeutics. *Arch Neurol* 56:1079-1084.

20. Derwenskus, J., and F.D. Lublin. 2006. Use of interferon-beta in the treatment of multiple sclerosis. *Adv Neurol* 98:257-271.
21. Steinman, L. 2001. Immunotherapy of multiple sclerosis: the end of the beginning. *Curr Opin Immunol* 13:597-600.
22. Polman, C.H., P.W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D.H. Miller, J.T. Phillips, F.D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M.A. Panzara, and A.W. Sandrock. 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354:899-910.
23. Steinman, L. 2005. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 4:510-518.
24. Kleinschmidt-DeMasters, B.K., and K.L. Tyler. 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 353:369-374.
25. Langer-Gould, A., S.W. Atlas, A.J. Green, A.W. Bollen, and D. Pelletier. 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med* 353:375-381.
26. Yousry, T.A., E.O. Major, C. Ryschkewitsch, G. Fahle, S. Fischer, J. Hou, B. Curfman, K. Miszkiel, N. Mueller-Lenke, E. Sanchez, F. Barkhof, E.W. Radue, H.R. Jager, and D.B. Clifford. 2006. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354:924-933.
27. Wiendl, H., and R. Hohlfeld. 2002. Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs* 16:183-200.
28. Hohlfeld, R., and H. Wiendl. 2001. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neurol* 49:281-284.
29. Zhang, J., and G. Hutton. 2005. Role of magnetic resonance imaging and immunotherapy in treating multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 56:273-302.
30. Killestein, J., and C.H. Polman. 2005. Current trials in multiple sclerosis: established evidence and future hopes. *Curr Opin Neurol* 18:253-260.
31. Blevins, G., and R. Martin. 2003. Future immunotherapies in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 23:147-158.
32. Frohman, E.M., M.K. Racke, and C.S. Raine. 2006. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
33. Fontoura, P., L. Steinman, and A. Miller. 2006. Emerging therapeutic targets in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 19:260-266.
34. Harrison, L.C., and D.A. Hafler. 2000. Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 12:704-711.
35. Illei, G.G., and P.E. Lipsky. 2000. Novel, non-antigen-specific therapeutic approaches to autoimmune/inflammatory diseases. *Curr Opin Immunol* 12:712-718.
36. Martin, R., and H. McFarland. 1996. Experimental immunotherapies for multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol* 18:1-24.
37. Feldmann, M., and L. Steinman. 2005. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* 435:612-619.
38. Keane, J., S. Gershon, R.P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W.D. Schwietzman, J.N. Siegel, and M.M. Braun. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345:1098-1104.
39. Hohlfeld, R., and H. Wekerle. 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14599-14606.
40. Fontoura, P., H. Garren, and L. Steinman. 2005. Antigen-specific therapies in multiple sclerosis: going beyond proteins and peptides. *Int Rev Immunol* 24:415-446.
41. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Antigen-specific therapies in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol* 24:393-413.
42. Ferraro, A., and C.L. Cazzullo. 1949. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *J Neuropathol Exp Neurol* 8:61-69.
43. Ferraro, A., and C.L. Cazzullo. 1949. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs (Note II). *J Neuropathol Exp Neurol* 8:226-231.
44. Ferraro, A., L. Roizin, and C.L. Cazzullo. 1950. Experimental studies in allergic encephalomyelitis. Prevention and production - Note III. *J Neuropathol Exp Neurol* 9:18-28.
45. Condie, R.M., J.T. Kelly, B. Campbell, and R.A. Good. 1957. Prevention of experimental encephalomyelitis by prior injections of homologous spinal cord. *Fed Proc* 16:24.
46. Zeman, W. 1958. Untersuchungen zur Verhütung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis. *J Neurol* 177:451-457.
47. Kies, M.W., and E.C. Alvord, Jr. 1958. [Prevention of allergic encephalomyelitis by prior injection of adjuvants.]. *Nature* 182:1106.

48. Shaw, C.M., E.C. Alvord, Jr., W.J. Fahlberg, and M.W. Kies. 1962. Adjuvant-antigen relationships in the production of experimental "allergic" encephalomyelitis in the guinea pig. *J Exp Med* 115:169-179.
49. Lumsden, C.E. 1949. Experimental "allergic" encephalomyelitis. II. On the nature of the encephalitogenic agent. *Brain* 72:517-537.
50. Svet-Moldavskaya, I.A., and G.J. Svet-Moldavsky. 1958. Acquired resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 181:1536-1537.
51. Svet-Moldavsky, G.J., I.A. Svet-Moldavskaya, and L.I. Raffkina. 1959. Various types of acquired resistance to experimental 'allergic' encephalomyelitis. *Nature* 184:1552-1553.
52. Shaw, C.M., W.J. Fahlberg, M.W. Kies, and E.C. Alvord, Jr. 1960. Suppression of experimental "allergic" encephalomyelitis in guinea pigs by encephalitogenic proteins extracted from homologous brain. *J Exp Med* 111:171-180.
53. Eylar, E.H., J. Jackson, B. Rothenberg, and S.W. Brostoff. 1972. Suppression of the immune response: reversal of the disease state with antigen in allergic encephalomyelitis. *Nature* 236:74-76.
54. Driscoll, B.F., M.W. Kies, and E.C. Alvord, Jr. 1974. Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in guinea pigs with homologous myelin basic protein. *J Immunol* 112:392-397.
55. Driscoll, B.F., M.W. Kies, and E.C. Alvord, Jr. 1976. Protection against experimental allergic encephalomyelitis with peptides derived from myelin basic protein: presence of intact encephalitogenic site is essential. *J Immunol* 117:110-114.
56. Chou, F.C., C.H. Chou, R.B. Fritz, and R.F. Kibler. 1980. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats with peptide 68-88 of guinea pig myelin basic protein. *Ann Neurol* 7:336-339.
57. Swanborg, R.H. 1972. Antigen-induced inhibition of experimental allergic encephalomyelitis. I. Inhibition in guinea pigs injected with non-encephalitogenic modified myelin basic protein. *J Immunol* 109:540-546.
58. Swanborg, R.H. 1975. Antigen-induced inhibition of experimental allergic encephalomyelitis. III. Localization of an inhibitory site distinct from the major encephalitogenic determinant of myelin basic protein. *J Immunol* 114:191-194.
59. Swanborg, R.H. 1975. Antigen-induced inhibition of experimental allergic encephalomyelitis. IV. Studies of the C-terminal end of the myelin basic protein molecule (1). *Immunol Commun* 4:387-397.
60. Paterson, P.Y., and S.M. Harwin. 1963. Suppression of allergic encephalomyelitis in rats by means of antibrain serum. *J Exp Med* 117:755-774.
61. Alvord, E.C., Jr., C.M. Shaw, S. Hruby, and M.W. Kies. 1965. Encephalitogen-Induced Inhibition of Experimental Allergic Encephalomyelitis: Prevention, Suppression and Therapy. *Ann N Y Acad Sci* 122:333-345.
62. Shaw, C.M., E.C. Alvord, Jr., J. Kaku, and M.W. Kies. 1965. Correlation of Experimental Allergic Encephalomyelitis with Delayed-Type Skin Sensitivity to Specific Homologous Encephalitogen. *Ann N Y Acad Sci* 122:318-331.
63. Harwin, S.M., and P.Y. Paterson. 1962. Antibrain antibodies of the 19S gamma-globulin type in rats with allergic encephalomyelitis. *Nature* 194:391-392.
64. Lisak, R.P., G.A. Falk, R.G. Heinze, M.W. Kies, and E.C. Alvord, Jr. 1970. Dissociation of antibody production from disease suppression in the inhibition of allergic encephalomyelitis by myelin basic protein. *J Immunol* 104:1435-1446.
65. Swierkosz, J.E., and R.H. Swanborg. 1975. Suppressor cell control of unresponsiveness to experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 115:631-633.
66. Swierkosz, J.E., and R.H. Swanborg. 1977. Immunoregulation of experimental allergic encephalomyelitis: conditions for induction of suppressor cells and analysis of mechanism. *J Immunol* 119:1501-1506.
67. Ben-Nun, A., and I.R. Cohen. 1982. Spontaneous remission and acquired resistance to autoimmune encephalomyelitis (EAE) are associated with suppression of T cell reactivity: suppressed EAE effector T cells recovered as T cell lines. *J Immunol* 128:1450-1457.
68. Ben-Nun, A., Y. Ron, and I.R. Cohen. 1980. Spontaneous remission of autoimmune encephalomyelitis is inhibited by splenectomy, thymectomy or ageing. *Nature* 288:389-390.
69. Campbell, B., P.J. Vogel, E. Fisher, and R. Lorenz. 1973. Myelin basic protein administration in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 29:10-15.
70. Gonsette, R.E., P. Delmotte, and L. Demonty. 1977. Failure of basic protein therapy for multiple sclerosis. *Journal of neurology* 216:27-31.
71. Alvord, E.C., Jr., C.M. Shaw, S. Hruby, and M.W. Kies. 1979. Has myelin basic protein received a fair trial in the treatment of multiple sclerosis? *Ann Neurol* 6:461-468.
72. Alvord, E.C., Jr., C.M. Shaw, and S. Hruby. 1979. Myelin basic protein treatment of experimental allergic encephalomyelitis in monkeys. *Ann Neurol* 6:469-473.

73. Weiner, H.L. 1997. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 48:341-351.
74. Faria, A.M., and H.L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev* 206:232-259.
75. Weiner, H.L. 2004. Current issues in the treatment of human diseases by mucosal tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1029:211-224.
76. Weiner, H.L., G.A. Mackin, M. Matsui, E.J. Orav, S.J. Khoury, D.M. Dawson, and D.A. Hafler. 1993. Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. *Science* 259:1321-1324.
77. Hohol, M.J., S.J. Khoury, S.L. Cook, E.J. Orav, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1996. Three-year open protocol continuation study of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis and design of a phase III pivotal trial. *Ann N Y Acad Sci* 778:243-250.
78. Fukaura, H., S.C. Kent, M.J. Pietrusewicz, S.J. Khoury, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 1996. Antigen-specific TGF-beta1 secretion with bovine myelin oral tolerization in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 778:251-257.
79. Fukaura, H., S.C. Kent, M.J. Pietrusewicz, S.J. Khoury, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 1996. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 98:70-77.
80. Panitch, H., G. Francis, and O.M.S. Group. 1997. Clinical results of a phase III trial of oral myelin in relapsing-remitting multiple sclerosis [abstract]. *Ann Neurol* 42:459.
81. Francis, G., A. Evans, and H. Panitch. 1997. MRI results of a phase III trial of oral myelin in relapsing-remitting multiple sclerosis [abstract]. *Ann Neurol* 42:467.
82. Teitelbaum, D., R. Arnon, and M. Sela. 1999. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3842-3847.
83. Aharoni, R., A. Meshorer, M. Sela, and R. Arnon. 2002. Oral treatment of mice with copolymer 1 (glatiramer acetate) results in the accumulation of specific Th2 cells in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 126:58-68.
84. Teitelbaum, D., R. Aharoni, E. Klinger, R. Kreitman, E. Raymond, A. Malley, R. Shofti, M. Sela, and R. Arnon. 2004. Oral glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical and immunological studies. *Ann N Y Acad Sci* 1029:239-249.
85. Filippi, M., J.S. Wolinsky, and G. Comi. 2006. Effects of oral glatiramer acetate on clinical and MRI-monitored disease activity in patients with relapsing multiple sclerosis: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Neurol* 5:213-220.
86. Shi, F.D., X.F. Bai, B.G. Xiao, P.H. van der Meide, and H. Link. 1998. Nasal administration of multiple antigens suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis, encephalomyelitis and neuritis. *Journal of the neurological sciences* 155:1-12.
87. Xu, L.Y., J.S. Yang, Y.M. Huang, M. Levi, H. Link, and B.G. Xiao. 2000. Combined nasal administration of encephalitogenic myelin basic protein peptide 68-86 and IL-10 suppressed incipient experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin Immunol* 96:205-211.
88. Melo, M.E., D.B. Stevens, E.E. Sercarz, and C.R. Gabaglia. 2004. Nasal instillation of gpMBP can exacerbate murine EAE: effect of mucosal priming is an age-dependent phenomenon. *J Autoimmun* 22:13-20.
89. Warren, K.G., and I. Catz. 1995. Administration of myelin basic protein synthetic peptides to multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences* 133:85-94.
90. Warren, K.G., and I. Catz. 1997. The effect of intrathecal MBP synthetic peptides containing epitope P85 VVHFFKNIVTP96 on free anti-MBP levels in acute relapsing multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 148:67-78.
91. Warren, K.G., I. Catz, and K.W. Wucherpfennig. 1997. Tolerance induction to myelin basic protein by intravenous synthetic peptides containing epitope P85 VVHFFKNIVTP96 in chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 152:31-38.
92. Warren, K.G., and I. Catz. 2000. Kinetic profiles of cerebrospinal fluid anti-MBP in response to intravenous MBP synthetic peptide DENP(85)VVHFFKNIVTP(96)RT in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 6:300-311.
93. Catz, I., K.G. Warren, L.Z. Ferenczi, and M.J. Krantz. 2006. Intravenous Synthetic Peptide MBP8298 Significantly Delayed Disease Progression in an HLA Class II-Defined Cohort of Patients with Progressive Multiple Sclerosis [abstract]. In American Academy of Neurology, San Diego, CA.
94. Miller, S.D., R.P. Wetzig, and H.N. Claman. 1979. The induction of cell-mediated immunity and tolerance with protein antigens coupled to syngeneic lymphoid cells. *J Exp Med* 149:758-773.
95. Jenkins, M.K., and R.H. Schwartz. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165:302-319.

96. Sriram, S., G. Schwartz, and L. Steinman. 1983. Administration of myelin basic protein-coupled spleen cells prevents experimental allergic encephalitis. *Cell Immunol* 75:378-382.
97. Kennedy, M.K., L.J. Tan, M.C. Dal Canto, V.K. Tuohy, Z.J. Lu, J.L. Trotter, and S.D. Miller. 1990. Inhibition of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by immune tolerance to proteolipid protein and its encephalitogenic peptides. *J Immunol* 144:909-915.
98. Ben-Nun, A., and S. Yossefi. 1990. Reversal of autoimmune encephalomyelitis by membranes presenting myelin basic protein-associated class II MHC molecule as an approach to immunotherapy of organ-specific autoimmune diseases. *European journal of immunology* 20:357-361.
99. Sharma, S.D., B. Nag, X.M. Su, D. Green, E. Spack, B.R. Clark, and S. Sriram. 1991. Antigen-specific therapy of experimental allergic encephalomyelitis by soluble class II major histocompatibility complex-peptide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11465-11469.
100. Burrows, G.G., B.F. Bebo, Jr., K.L. Adlard, A.A. Vandenbark, and H. Offner. 1998. Two-domain MHC class II molecules form stable complexes with myelin basic protein 69-89 peptide that detect and inhibit rat encephalitogenic T cells and treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 161:5987-5996.
101. Goodkin, D.E., M. Shulman, J. Winkelhake, E. Waubant, P. Andersson, T. Stewart, S. Nelson, N. Fischbein, P.K. Coyle, E. Frohman, L. Jacobs, J. Holcenberg, M. Lee, and S. Mocchi. 2000. A phase I trial of solubilized DR2:MBP84-102 (AG284) in multiple sclerosis. *Neurology* 54:1414-1420.
102. Elliott, E.A., R. Cofield, J.A. Wilkins, C.S. Raine, L.A. Matis, and J.P. Mueller. 1997. Immune tolerance mediated by recombinant proteolipid protein prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 79:1-11.
103. Elliott, E.A., H.I. McFarland, S.H. Nye, R. Cofield, T.M. Wilson, J.A. Wilkins, S.P. Squinto, L.A. Matis, and J.P. Mueller. 1996. Treatment of experimental encephalomyelitis with a novel chimeric fusion protein of myelin basic protein and proteolipid protein. *J Clin Invest* 98:1602-1612.
104. McFarland, H.I., A.A. Lobito, M.M. Johnson, G.R. Palardy, C.S. Yee, E.K. Jordan, J.A. Frank, N. Tresser, C.P. Genain, J.P. Mueller, L.A. Matis, and M.J. Lenardo. 2001. Effective antigen-specific immunotherapy in the marmoset model of multiple sclerosis. *J Immunol* 166:2116-2121.
105. Kuerten, S., F.S. Lichtenegger, S. Faas, D.N. Angelov, M. Tary-Lehmann, and P.V. Lehmann. 2006. MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice.
106. Jordan, E.K., H.I. McFarland, B.K. Lewis, N. Tresser, M.A. Gates, M. Johnson, M. Lenardo, L.A. Matis, H.F. McFarland, and J.A. Frank. 1999. Serial MR imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by human white matter or by chimeric myelin-basic and proteolipid protein in the common marmoset. *AJNR Am J Neuroradiol* 20:965-976.
107. Zhong, M.C., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun. 2002. Multiantigen/multiepitope-directed immune-specific suppression of "complex autoimmune encephalomyelitis" by a novel protein product of a synthetic gene. *J Clin Invest* 110:81-90.
108. Arnon, R., and M. Sela. 2003. Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate. *J Mol Recognit* 16:412-421.
109. Teitelbaum, D., R. Arnon, and M. Sela. 1997. Copolymer 1: from basic research to clinical application. *Cell Mol Life Sci* 53:24-28.
110. Sela, M. 2006. Immunomodulatory vaccines against autoimmune diseases. *Rejuvenation Res* 9:126-133.
111. Teitelbaum, D., A. Meshorer, T. Hirshfeld, R. Arnon, and M. Sela. 1971. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1:242-248.
112. Teitelbaum, D., C. Webb, A. Meshorer, R. Arnon, and M. Sela. 1972. Protection against experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 240:564-566.
113. Teitelbaum, D., C. Webb, M. Bree, A. Meshorer, R. Arnon, and M. Sela. 1974. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Rhesus monkeys by a synthetic basic copolymer. *Clin Immunol Immunopathol* 3:256-262.
114. Abramsky, O., D. Teitelbaum, and R. Arnon. 1977. Effect of a synthetic polypeptide (COP 1) on patients with multiple sclerosis and with acute disseminated encephalomyelitis. Preliminary report. *J Neurol Sci* 31:433-438.
115. Bornstein, M.B., A.I. Miller, D. Teitelbaum, R. Arnon, and M. Sela. 1982. Multiple sclerosis: trial of a synthetic polypeptide. *Ann Neurol* 11:317-319.
116. Bornstein, M.B., A. Miller, S. Slagle, M. Weitzman, H. Crystal, E. Drexler, M. Keilson, A. Merriam, S. Wassertheil-Smoller, V. Spada, and et al. 1987. A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 317:408-414.

117. Bornstein, M.B., A. Miller, S. Slagle, M. Weitzman, E. Drexler, M. Keilson, V. Spada, W. Weiss, S. Appel, L. Rolak, and et al. 1991. A placebo-controlled, double-blind, randomized, two-center, pilot trial of Cop 1 in chronic progressive multiple sclerosis. *Neurology* 41:533-539.
118. Johnson, K.P., B.R. Brooks, J.A. Cohen, C.C. Ford, J. Goldstein, R.P. Lisak, L.W. Myers, H.S. Panitch, J.W. Rose, and R.B. Schiffer. 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45:1268-1276.
119. Wolinsky, J.S. 1995. Copolymer 1: a most reasonable alternative therapy for early relapsing-remitting multiple sclerosis with mild disability. *Neurology* 45:1245-1247.
120. Wolinsky, J.S. 2006. The use of glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Adv Neurol* 98:273-292.
121. Miller, A.E. 2005. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:215-231, viii.
122. Neuhaus, O., C. Farina, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 2001. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 56:702-708.
123. Yong, V.W. 2002. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 59:802-808.
124. Arnon, R., and R. Aharoni. 2004. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14593-14598.
125. Hafler, D.A. 2002. Degeneracy, as opposed to specificity, in immunotherapy. *J Clin Invest* 109:581-584.
126. Farina, C., M.S. Weber, E. Meinl, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 2005. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol* 4:567-575.
127. Teitelbaum, D., R. Aharoni, R. Arnon, and M. Sela. 1988. Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer Cop 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9724-9728.
128. Teitelbaum, D., R. Milo, R. Arnon, and M. Sela. 1992. Synthetic copolymer 1 inhibits human T-cell lines specific for myelin basic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:137-141.
129. Aharoni, R., D. Teitelbaum, R. Arnon, and M. Sela. 1999. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:634-639.
130. Fridkis-Hareli, M., D. Teitelbaum, E. Gurevich, I. Pecht, C. Brautbar, O.J. Kwon, T. Brenner, R. Arnon, and M. Sela. 1994. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells-specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4872-4876.
131. Fridkis-Hareli, M., and J.L. Strominger. 1998. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. *J Immunol* 160:4386-4397.
132. Fridkis-Hareli, M., J.M. Neveu, R.A. Robinson, W.S. Lane, L. Gauthier, K.W. Wucherpfennig, M. Sela, and J.L. Strominger. 1999. Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis- and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules. *J Immunol* 162:4697-4704.
133. Lando, Z., D. Teitelbaum, and R. Arnon. 1979. Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice unresponsive to EAE. *J Immunol* 123:2156-2160.
134. Aharoni, R., D. Teitelbaum, M. Sela, and R. Arnon. 1997. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10821-10826.
135. Aharoni, R., D. Teitelbaum, M. Sela, and R. Arnon. 1998. Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1. *J Neuroimmunol* 91:135-146.
136. Aharoni, R., D. Teitelbaum, O. Leitner, A. Meshorer, M. Sela, and R. Arnon. 2000. Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11472-11477.
137. Miller, A., S. Shapiro, R. Gershtein, A. Kinarty, H. Rawashdeh, S. Honigman, and N. Lahat. 1998. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 92:113-121.
138. Duda, P.W., M.C. Schmied, S.L. Cook, J.I. Krieger, and D.A. Hafler. 2000. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 105:967-976.
139. Neuhaus, O., C. Farina, A. Yassouridis, H. Wiendl, F. Then Bergh, T. Dose, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 2000. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7452-7457.

140. Qin, Y., D.Q. Zhang, A. Prat, S. Pouly, and J. Antel. 2000. Characterization of T cell lines derived from glatiramer-acetate-treated multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 108:201-206.
141. Ragheb, S., S. Abramczyk, D. Lisak, and R. Lisak. 2001. Long-term therapy with glatiramer acetate in multiple sclerosis: effect on T-cells. *Mult Scler* 7:43-47.
142. Chen, M., B. Gran, K. Costello, K. Johnson, R. Martin, and S. Dhib-Jalbut. 2001. Glatiramer acetate induces a Th2-biased response and crossreactivity with myelin basic protein in patients with MS. *Mult Scler* 7:209-219.
143. Farina, C., F. Then Bergh, H. Albrecht, E. Meinl, A. Yassouridis, O. Neuhaus, and R. Hohlfeld. 2001. Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells. *Brain* 124:705-719.
144. Brenner, T., R. Arnon, M. Sela, O. Abramsky, Z. Meiner, R. Riven-Kreitman, N. Tarcik, and D. Teitelbaum. 2001. Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone. *J Neuroimmunol* 115:152-160.
145. Dhib-Jalbut, S., M. Chen, A. Said, M. Zhan, K.P. Johnson, and R. Martin. 2003. Glatiramer acetate-reactive peripheral blood mononuclear cells respond to multiple myelin antigens with a Th2-biased phenotype. *J Neuroimmunol* 140:163-171.
146. Karandikar, N.J., M.P. Crawford, X. Yan, R.B. Ratts, J.M. Brenchley, D.R. Ambrozak, A.E. Lovett-Racke, E.M. Frohman, P. Stastny, D.C. Douek, R.A. Koup, and M.K. Racke. 2002. Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 109:641-649.
147. Tennakoon, D.K., R.S. Mehta, S.B. Ortega, V. Bhoj, M.K. Racke, and N.J. Karandikar. 2006. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 176:7119-7129.
148. Ratts, R.B., A.E. Lovett-Racke, J. Choy, S.C. Northrop, R.Z. Hussain, N.J. Karandikar, and M.K. Racke. 2006. CD28(-)CD57(+) T cells predominate in CD8 responses to glatiramer acetate. *J Neuroimmunol*:Publicação on-line antes da impressão.
149. Weber, M.S., M. Starck, S. Wagenpfeil, E. Meinl, R. Hohlfeld, and C. Farina. 2004. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain* 127:1370-1378.
150. Li, Q., R. Milo, H. Panitch, P. Swoveland, and C.T. Bever, Jr. 1998. Glatiramer acetate blocks the activation of THP-1 cells by interferon-gamma. *Eur J Pharmacol* 342:303-310.
151. Kim, H.J., I. Ifergan, J.P. Antel, R. Seguin, M. Duddy, Y. Lapierre, F. Jalili, and A. Bar-Or. 2004. Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 172:7144-7153.
152. Kerschensteiner, M., C. Stadelmann, G. Dechant, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 2003. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 53:292-304.
153. Kerschensteiner, M., E. Gallmeier, L. Behrens, V.V. Leal, T. Misgeld, W.E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R.L. Oropenza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 1999. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189:865-870.
154. Stadelmann, C., M. Kerschensteiner, T. Misgeld, W. Bruck, R. Hohlfeld, and H. Lassmann. 2002. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125:75-85.
155. Ziemssen, T., T. Kumpfel, W.E. Klinkert, O. Neuhaus, and R. Hohlfeld. 2002. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. *Brain* 125:2381-2391.
156. Chen, M., R.M. Valenzuela, and S. Dhib-Jalbut. 2003. Glatiramer acetate-reactive T cells produce brain-derived neurotrophic factor. *J Neurol Sci* 215:37-44.
157. Aharoni, R., B. Kayhan, R. Eilam, M. Sela, and R. Arnon. 2003. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14157-14162.
158. Azoulay, D., V. Vachapova, B. Shihman, A. Miler, and A. Karni. 2005. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol* 167:215-218.
159. Aharoni, R., R. Eilam, H. Domev, G. Labunskay, M. Sela, and R. Arnon. 2005. The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19045-19050.
160. Kipnis, J., and M. Schwartz. 2002. Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends Mol Med* 8:319-323.

161. Kreitman, R.R., and F. Blanchette. 2004. On the horizon: possible neuroprotective role for glatiramer acetate. *Mult Scler* 10 Suppl 1:S81-86; discussion S86-89.
162. Kipnis, J., E. Yoles, Z. Porat, A. Cohen, F. Mor, M. Sela, I.R. Cohen, and M. Schwartz. 2000. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7446-7451.
163. Schori, H., J. Kipnis, E. Yoles, E. WoldeMussie, G. Ruiz, L.A. Wheeler, and M. Schwartz. 2001. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3398-3403.
164. Angelov, D.N., S. Waibel, O. Guntinas-Lichius, M. Lenzen, W.F. Neiss, T.L. Tomov, E. Yoles, J. Kipnis, H. Schori, A. Reuter, A. Ludolph, and M. Schwartz. 2003. Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4790-4795.
165. Hong, J., Y.C. Zang, G. Hutton, V.M. Rivera, and J.Z. Zhang. 2004. Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 152:126-139.
166. Fridkis-Hareli, M., L. Santambrogio, J.N. Stern, L. Fugger, C. Brosnan, and J.L. Strominger. 2002. Novel synthetic amino acid copolymers that inhibit autoantigen-specific T cell responses and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 109:1635-1643.
167. Illes, Z., J.N. Stern, J. Reddy, H. Waldner, M.P. Mycko, C.F. Brosnan, S. Ellmerich, D.M. Altmann, L. Santambrogio, J.L. Strominger, and V.K. Kuchroo. 2004. Modified amino acid copolymers suppress myelin basic protein 85-99-induced encephalomyelitis in humanized mice through different effects on T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11749-11754.
168. Stern, J.N., Z. Illes, J. Reddy, D.B. Keskin, E. Sheu, M. Fridkis-Hareli, H. Nishimura, C.F. Brosnan, L. Santambrogio, V.K. Kuchroo, and J.L. Strominger. 2004. Amelioration of proteolipid protein 139-151-induced encephalomyelitis in SJL mice by modified amino acid copolymers and their mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11743-11748.
169. Fridkis-Hareli, M., J.N. Stern, L. Fugger, and J.L. Strominger. 2001. Synthetic peptides that inhibit binding of the myelin basic protein 85-99 epitope to multiple sclerosis-associated HLA-DR2 molecules and MBP-specific T-cell responses. *Hum Immunol* 62:753-763.
170. Ruiz, P.J., J.J. DeVoss, L.V. Nguyen, P.P. Fontoura, D.L. Hirschberg, D.J. Mitchell, K.C. Garcia, and L. Steinman. 2001. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis with ordered peptides based on MHC-TCR binding motifs. *J Immunol* 167:2688-2693.
171. Kersh, G.J., and P.M. Allen. 1996. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* 380:495-498.
172. Kersh, G.J., and P.M. Allen. 1996. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *J Exp Med* 184:1259-1268.
173. Evavold, B.D., and P.M. Allen. 1991. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* 252:1308-1310.
174. Evavold, B.D., J. Sloan-Lancaster, and P.M. Allen. 1993. Tickling the TCR: selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands. *Immunol Today* 14:602-609.
175. Sloan-Lancaster, J., B.D. Evavold, and P.M. Allen. 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 363:156-159.
176. Bielekova, B., and R. Martin. 2001. Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands. *J Mol Med* 79:552-565.
177. Hemmer, B., I. Stefanova, M. Vergelli, R.N. Germain, and R. Martin. 1998. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol* 160:5807-5814.
178. Sakai, K., S.S. Zamvil, D.J. Mitchell, S. Hodgkinson, J.B. Rothbard, and L. Steinman. 1989. Prevention of experimental encephalomyelitis with peptides that block interaction of T cells with major histocompatibility complex proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9470-9474.
179. Wraith, D.C., D.E. Smilek, D.J. Mitchell, L. Steinman, and H.O. McDevitt. 1989. Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell* 59:247-255.
180. Kumar, V., J.L. Urban, S.J. Horvath, and L. Hood. 1990. Amino acid variations at a single residue in an autoimmune peptide profoundly affect its properties: T-cell activation, major histocompatibility complex binding, and ability to block experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1337-1341.
181. Smilek, D.E., D.C. Wraith, S. Hodgkinson, S. Dwivedy, L. Steinman, and H.O. McDevitt. 1991. A single amino acid change in a myelin basic protein peptide confers the capacity to

- prevent rather than induce experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9633-9637.
182. Pearson, C.I., W. van Ewijk, and H.O. McDevitt. 1997. Induction of apoptosis and T helper 2 (Th2) responses correlates with peptide affinity for the major histocompatibility complex in self-reactive T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 185:583-599.
183. Nicholson, L.B., J.M. Greer, R.A. Sobel, M.B. Lees, and V.K. Kuchroo. 1995. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 3:397-405.
184. Santambrogio, L., M.B. Lees, and R.A. Sobel. 1998. Altered peptide ligand modulation of experimental allergic encephalomyelitis: immune responses within the CNS. *J Neuroimmunol* 81:1-13.
185. Nicholson, L.B., A. Murtaza, B.P. Hafler, A. Sette, and V.K. Kuchroo. 1997. A T cell receptor antagonist peptide induces T cells that mediate bystander suppression and prevent autoimmune encephalomyelitis induced with multiple myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9279-9284.
186. Young, D.A., L.D. Lowe, S.S. Booth, M.J. Whitters, L. Nicholson, V.K. Kuchroo, and M. Collins. 2000. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164:3563-3572.
187. Fischer, F.R., L. Santambrogio, Y. Luo, M.A. Berman, W.W. Hancock, and M.E. Dorf. 2000. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. *J Neuroimmunol* 110:195-208.
188. Nicholson, L.B., H. Waldner, A.M. Carrizosa, A. Sette, M. Collins, and V.K. Kuchroo. 1998. Heteroclitic proliferative responses and changes in cytokine profile induced by altered peptides: implications for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:264-269.
189. Karin, N., D.J. Mitchell, S. Brocke, N. Ling, and L. Steinman. 1994. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 180:2227-2237.
190. Windhagen, A., C. Scholz, P. Hollsberg, H. Fukaura, A. Sette, and D.A. Hafler. 1995. Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. *Immunity* 2:373-380.
191. Brocke, S., K. Gijbels, M. Allegretta, I. Ferber, C. Piercy, T. Blankenstein, R. Martin, U. Utz, N. Karin, D. Mitchell, T. Veromaa, A. Waisman, A. Gaur, P. Conlon, N. Ling, P.J. Fairchild, D.C. Wraith, A. O'Garra, C.G. Fathman, and L. Steinman. 1996. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 379:343-346.
192. Crowe, P.D., Y. Qin, P.J. Conlon, and J.P. Antel. 2000. NBI-5788, an altered MBP83-99 peptide, induces a T-helper 2-like immune response in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 48:758-765.
193. Kappos, L., G. Comi, H. Panitch, J. Oger, J. Antel, P. Conlon, and L. Steinman. 2000. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nat Med* 6:1176-1182.
194. Bielekova, B., B. Goodwin, N. Richert, I. Cortese, T. Kondo, G. Afshar, B. Gran, J. Eaton, J. Antel, J.A. Frank, H.F. McFarland, and R. Martin. 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 6:1167-1175.
195. PRNewswire-FirstCall. 2006. Neurocrine Biosciences, Inc. (NBIX) Kills MS Program After Phase II Clinical Failure, http://www.biospace.com/news_story.aspx?StoryID=11909.
196. McDonnell, W.M., and F.K. Askari. 1996. DNA vaccines. *N Engl J Med* 334:42-45.
197. Donnelly, J.J., J.B. Ulmer, J.W. Shiver, and M.A. Liu. 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
198. Robinson, H.L., and C.A. Torres. 1997. DNA vaccines. *Semin Immunol* 9:271-283.
199. Lee, D.J., M. Corr, and D.A. Carson. 1998. Control of immune responses by gene immunization. *Ann Med* 30:460-468.
200. Corr, M., and H. Tighe. 1997. Plasmid DNA vaccination: mechanism of antigen presentation. *Springer Semin Immunopathol* 19:139-145.
201. Mor, G. 1998. Plasmid DNA: a new era in vaccinology. *Biochem Pharmacol* 55:1151-1153.
202. Cohen, A.D., J.D. Boyer, and D.B. Weiner. 1998. Modulating the immune response to genetic immunization. *Faseb J* 12:1611-1626.
203. Koide, Y., T. Nagata, A. Yoshida, and M. Uchijima. 2000. DNA vaccines. *Jpn J Pharmacol* 83:167-174.

204. Gurunathan, S., C.Y. Wu, B.L. Freidag, and R.A. Seder. 2000. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* 12:442-447.
205. Gurunathan, S., D.M. Klinman, and R.A. Seder. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 18:927-974.
206. Garren, H., and L. Steinman. 2000. DNA vaccination in the treatment of autoimmune disease. *Curr Dir Autoimmun* 2:203-216.
207. Mathisen, P.M., and V.K. Tuohy. 2000. Gene therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Immunol* 20:327-333.
208. Seder, R.A., and S. Gurunathan. 1999. DNA vaccines--designer vaccines for the 21st century. *N Engl J Med* 341:277-278.
209. Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P.L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-1468.
210. Ulmer, J.B., J.J. Donnelly, S.E. Parker, G.H. Rhodes, P.L. Felgner, V.J. Dwarki, S.H. Gromkowski, R.R. Deck, C.M. DeWitt, A. Friedman, and et al. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745-1749.
211. Tang, D.C., M. DeVit, and S.A. Johnston. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-154.
212. Tighe, H., M. Corr, M. Roman, and E. Raz. 1998. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* 19:89-97.
213. Manders, P., and R. Thomas. 2000. Immunology of DNA vaccines: CpG motifs and antigen presentation. *Inflamm Res* 49:199-205.
214. Krieg, A.M., and H. Wagner. 2000. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 21:521-526.
215. Wagner, H. 2001. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 14:499-502.
216. Krieg, A.M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709-760.
217. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-680.
218. Krieg, A.M., A.K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G.A. Koretzky, and D.M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
219. Sato, Y., M. Roman, H. Tighe, D. Lee, M. Corr, M.D. Nguyen, G.J. Silverman, M. Lotz, D.A. Carson, and E. Raz. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273:352-354.
220. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
221. Bauer, S., C.J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G.B. Lipford. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9237-9242.
222. Kozak, M. 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12:857-872.
223. Kozak, M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196:947-950.
224. Danko, I., J.D. Fritz, S. Jiao, K. Hogan, J.S. Latendresse, and J.A. Wolff. 1994. Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther* 1:114-121.
225. Stevenson, F.K., C.H. Ottensmeier, P. Johnson, D. Zhu, S.L. Buchan, K.J. McCann, J.S. Roddick, A.T. King, F. McNicholl, N. Savelyeva, and J. Rice. 2004. DNA vaccines to attack cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14646-14652.
226. Estcourt, M.J., A.J. McMichael, and T. Hanke. 2004. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol Rev* 199:144-155.
227. Goonetilleke, N., S. Moore, L. Dally, N. Winstone, I. Cebere, A. Mahmoud, S. Pinheiro, G. Gillespie, D. Brown, V. Loach, J. Roberts, A. Guimaraes-Walker, P. Hayes, K. Loughran, C. Smith, J. De Bont, C. Verlinde, D. Vooijs, C. Schmidt, M. Boaz, J. Gilmour, P. Fast, L. Dorrell, T. Hanke, and A.J. McMichael. 2006. Induction of multifunctional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 Gag coupled to CD8+ T-cell epitopes. *J Virol* 80:4717-4728.
228. Rottinghaus, S.T., G.A. Poland, R.M. Jacobson, L.J. Barr, and M.J. Roy. 2003. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine* 21:4604-4608.

229. He, X.W., F. Wang, L. Jiang, J. Li, S.K. Liu, Z.Y. Xiao, X.Q. Jin, Y.N. Zhang, Y. He, K. Li, Y.J. Guo, and S.H. Sun. 2005. Induction of mucosal and systemic immune response by single-dose oral immunization with biodegradable microparticles containing DNA encoding HBsAg. *J Gen Virol* 86:601-610.
230. Smooker, P.M., A. Rainczuk, N. Kennedy, and T.W. Spithill. 2004. DNA vaccines and their application against parasites--promise, limitations and potential solutions. *Biotechnol Annu Rev* 10:189-236.
231. Wang, R., D.L. Doolan, T.P. Le, R.C. Hedstrom, K.M. Coonan, Y. Charoenvit, T.R. Jones, P. Hobart, M. Margalith, J. Ng, W.R. Weiss, M. Sedegah, C. de Taisne, J.A. Norman, and S.L. Hoffman. 1998. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 282:476-480.
232. Moore, A.C., and A.V. Hill. 2004. Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol Rev* 199:126-143.
233. Nor, N.M., and M. Musa. 2004. Approaches towards the development of a vaccine against tuberculosis: recombinant BCG and DNA vaccine. *Tuberculosis (Edinb)* 84:102-109.
234. Lowrie, D.B. 2006. DNA vaccines for therapy of tuberculosis: where are we now? *Vaccine* 24:1983-1989.
235. Lowrie, D.B. 1999. DNA vaccines against tuberculosis. *Curr Opin Mol Ther* 1:30-33.
236. Kent, S.J., A. Zhao, S.J. Best, J.D. Chandler, D.B. Boyle, and I.A. Ramshaw. 1998. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J Virol* 72:10180-10188.
237. Amara, R.R., F. Villinger, J.D. Altman, S.L. Lydy, S.P. O'Neil, S.I. Staprans, D.C. Montefiori, Y. Xu, J.G. Herndon, L.S. Wyatt, M.A. Candido, N.L. Kozyr, P.L. Earl, J.M. Smith, H.L. Ma, B.D. Grimm, M.L. Hulsey, J. Miller, H.M. McClure, J.M. McNicholl, B. Moss, and H.L. Robinson. 2001. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292:69-74.
238. Amara, R.R., F. Villinger, S.I. Staprans, J.D. Altman, D.C. Montefiori, N.L. Kozyr, Y. Xu, L.S. Wyatt, P.L. Earl, J.G. Herndon, H.M. McClure, B. Moss, and H.L. Robinson. 2002. Different patterns of immune responses but similar control of a simian-human immunodeficiency virus 89.6P mucosal challenge by modified vaccinia virus Ankara (MVA) and DNA/MVA vaccines. *J Virol* 76:7625-7631.
239. Robertson, J.S., and K. Cichutek. 2000. European Union guidance on the quality, safety and efficacy of DNA vaccines and regulatory requirements. *Dev Biol (Basel)* 104:53-56.
240. Smith, H.A., and D.M. Klinman. 2001. The regulation of DNA vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 12:299-303.
241. Ledwith, B.J., S. Manam, P.J. Troilo, A.B. Barnum, C.J. Pauley, T.G. Griffiths, 2nd, L.B. Harper, H.B. Schock, H. Zhang, J.E. Faris, P.A. Way, C.M. Beare, W.J. Bagdon, and W.W. Nichols. 2000. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel)* 104:33-43.
242. Mor, G., M. Singla, A.D. Steinberg, S.L. Hoffman, K. Okuda, and D.M. Klinman. 1997. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum Gene Ther* 8:293-300.
243. Mor, G., and M. Eliza. 2001. Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. *Mol Biotechnol* 19:245-250.
244. Prud'homme, G.J., B.R. Lawson, Y. Chang, and A.N. Theofilopoulos. 2001. Immunotherapeutic gene transfer into muscle. *Trends Immunol* 22:149-155.
245. Karin, N. 2004. Induction of protective therapy for autoimmune diseases by targeted DNA vaccines encoding pro-inflammatory cytokines and chemokines. *Curr Opin Mol Ther* 6:27-33.
246. Matsumoto, Y. 2005. New approach to immunotherapy against organ-specific autoimmune diseases with T cell receptor and chemokine receptor DNA vaccines. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5:73-77.
247. Coon, B., L.L. An, J.L. Whitton, and M.G. von Herrath. 1999. DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 104:189-194.
248. Quintana, F.J., A. Rotem, P. Carmi, and I.R. Cohen. 2000. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J Immunol* 165:6148-6155.
249. von Herrath, M.G., and J.L. Whitton. 2000. DNA vaccination to treat autoimmune diabetes. *Ann Med* 32:285-292.
250. Bot, A., D. Smith, S. Bot, A. Hughes, T. Wolfe, L. Wang, C. Woods, and M. von Herrath. 2001. Plasmid vaccination with insulin B chain prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 167:2950-2955.
251. Tisch, R., B. Wang, D.J. Weaver, B. Liu, T. Bui, J. Arthos, and D.V. Serreze. 2001. Antigen-specific mediated suppression of beta cell autoimmunity by plasmid DNA vaccination. *J Immunol* 166:2122-2132.

252. Prud'homme, G.J. 2003. Prevention of autoimmune diabetes by DNA vaccination. *Expert Rev Vaccines* 2:533-540.
253. Quintana, F.J., P. Carmi, and I.R. Cohen. 2002. DNA vaccination with heat shock protein 60 inhibits cyclophosphamide-accelerated diabetes. *J Immunol* 169:6030-6035.
254. Every, A.L., D.R. Kramer, S.I. Mannering, A.M. Lew, and L.C. Harrison. 2006. Intranasal vaccination with proinsulin DNA induces regulatory CD4+ T cells that prevent experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* 176:4608-4615.
255. Shigihara, T., A. Shimada, Y. Oikawa, H. Yoneyama, Y. Kanazawa, Y. Okubo, K. Matsushima, E. Yamato, J. Miyazaki, A. Kasuga, T. Saruta, and S. Narumi. 2005. CXCL10 DNA vaccination prevents spontaneous diabetes through enhanced beta cell proliferation in NOD mice. *J Immunol* 175:8401-8408.
256. Salomon, I., N. Netzer, G. Wildbaum, S. Schiff-Zuck, G. Maor, and N. Karin. 2002. Targeting the function of IFN-gamma-inducible protein 10 suppresses ongoing adjuvant arthritis. *J Immunol* 169:2685-2693.
257. Wildbaum, G., S. Youssef, and N. Karin. 2000. A targeted DNA vaccine augments the natural immune response to self TNF-alpha and suppresses ongoing adjuvant arthritis. *J Immunol* 165:5860-5866.
258. Youssef, S., G. Maor, G. Wildbaum, N. Grabie, A. Gour-Lavie, and N. Karin. 2000. C-C chemokine-encoding DNA vaccines enhance breakdown of tolerance to their gene products and treat ongoing adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 106:361-371.
259. Quintana, F.J., P. Carmi, F. Mor, and I.R. Cohen. 2002. Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. *J Immunol* 169:3422-3428.
260. Quintana, F.J., P. Carmi, F. Mor, and I.R. Cohen. 2003. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J Immunol* 171:3533-3541.
261. Mimran, A., F. Mor, P. Carmi, F.J. Quintana, V. Rotter, and I.R. Cohen. 2004. DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an antiergotypic response. *J Clin Invest* 113:924-932.
262. Goldberg, R., G. Wildbaum, Y. Zohar, G. Maor, and N. Karin. 2004. Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* 173:1171-1178.
263. Quintana, F.J., P. Carmi, F. Mor, and I.R. Cohen. 2004. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by DNA vaccination with the 70-kd or the 90-kd human heat-shock protein: immune cross-regulation with the 60-kd heat-shock protein. *Arthritis Rheum* 50:3712-3720.
264. Matsumoto, Y., Y. Jee, and M. Sugisaki. 2000. Successful TCR-based immunotherapy for autoimmune myocarditis with DNA vaccines after rapid identification of pathogenic TCR. *J Immunol* 164:2248-2254.
265. Matsumoto, Y. 2000. Characterization of T cell receptor (TCR) of organ-specific autoimmune disease-inducing T cells and TCR-based immunotherapy with DNA vaccines. *J Neuroimmunol* 110:1-12.
266. Matsumoto, Y., G. Kim, and N. Tanuma. 2000. Characterization of T cell receptor associated with the development of P2 peptide-induced autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 102:67-72.

SEGUNDA PARTE

CAPÍTULO IV

**Utilização de Vacinas de ADN Codificadoras de
Antigénios de Mielina como Terapêutica Antigénio-
Específica no Modelo de Encefalomielite Autoimune
Experimental.**

1. Introdução e antecedentes. Objectivos e plano experimental.

A utilização de vacinação com constructos de ADN (daqui em diante referida apenas como vacinação com ADN), como forma de terapêutica em modelos animais de doença autoimune, foi uma tecnologia utilizada, de forma pioneira, pelo laboratório do Prof. Lawrence STEINMAN no Instituto WEIZMANN, e depois na Universidade de Stanford. Inicialmente, a estratégia de vacinação utilizou constructos codificadores de proteínas contra as quais se pensava benéfico induzir uma reacção imune, tal como o receptor da célula T (TCR). Na sequência da identificação de um repertório limitado de utilização da cadeia beta do TCR em ratinhos com EAE, o seu grupo de investigação propôs-se utilizar vacinas de ADN como forma de supressão de clones patogénicos de células T, à semelhança do que já havia sido demonstrado com anticorpos específicos contra sequências da região variável do TCR, associadas à patogenicidade, ou com imunização com péptidos derivados da segunda ou terceira região determinadora de complementaridade da sequência V do TCR de linfócitos patogénicos (1-4). No modelo de EAE induzida em ratinhos PL/J (HLA H-2^u), a resposta linfocitária é mediada, sobretudo, por células T patogénicas que utilizam a cadeia V β 8.2 do TCR. WAISMAN *et al.*, elaboraram um constructo de ADN codificando esta cadeia V β , e utilizaram as vacinas de ADN assim obtidas para vacinar ratinhos PL/J antes da indução de EAE com o péptido AcMBP1-20 ou com a proteína básica de mielina. Em ambos os casos, a vacinação com ADN reduziu o número de animais doentes, bem como a severidade do curso clínico (5). Ao contrário do que seria expectável, não se assistiu a uma redução do número de linfócitos T exprimindo a cadeia V β 8.2 nos animais vacinados, mas sim a uma modificação do seu fenótipo efector, com alteração para um predomínio de resposta Th2. Estes primeiros resultados estabeleceram o princípio que a vacinação com ADN era uma modalidade terapêutica eficaz para o tratamento da EAE; igualmente, uma vez que o mecanismo de acção não se limitou, tal como esperado *a priori*, à eliminação dos clones potencialmente patogénicos, mas sim à modificação do

fenótipo efector das células T de Th1 para Th2, foi levantada a possibilidade de esta estratégia terapêutica mostrar eficácia em outras doenças autoimunes nas quais as células Th1 são consideradas patogénicas.

No seguimento deste primeiro trabalho, foram publicados resultados de um ensaio de prevenção de EAE com a utilização de vacinas de ADN codificadoras de proteína básica de mielina no modelo de EAE induzida em ratos Lewis (6). Os autores deste trabalho construíram vacinas de ADN em que a sequência codificadora era composta de 7 sequências do péptido MBP68-85 em *tandem* fundidas a um análogo sintético, denominado Z, do domínio B de ligação à IgG da proteína estafilocócica A, e utilizaram estas vacinas na prevenção de EAE induzida com MBP68-85 em ratos Lewis (o epítipo imunodominante para a indução de EAE nesta estirpe de rato). Os resultados deste ensaio confirmaram a eficácia na redução da incidência e gravidade clínica da EAE, e uma redução na capacidade secretória de IFN γ , por parte dos linfócitos T auto-reactivos, mas sem indicação de modificação do fenótipo *Th_{helper}* (Th); igualmente, foi demonstrada uma redução na produção de anticorpos contra o antígeno MBP68-85, sobretudo à custa dos valores de IgG total, e de IgG2a (6). Este foi o primeiro trabalho publicado com resultados da utilização de constructos de ADN codificadores de proteínas do *self* como terapêutica em modelos de autoimunidade; a administração de proteínas do *self*, e em particular de proteínas de mielina, já havia sido consagrada como forma de tolerização da resposta autoimune na EAE (conforme revisto no capítulo III e em (7-9)).

Utilizando o mesmo conceito de vacinação com um constructo-*self* como forma de tolerização em doenças autoimunes, o nosso grupo realizou experiências de vacinação com constructos de ADN codificando epítipos imunodominantes da proteína proteolipídica (PLP), tais como o péptido PLP139-151 ou PLP178-191, ou codificando o ligando peptídeo alterado (LPA) PLP139-151 (W144>L, H147>R), no modelo de EAE crónica induzida em ratinhos SJL/J (10). Para tal, foram clonados os minigenes PLP139-151, PLP178-191 e PLP139-151 (L/R) no vector de expressão mamífero pTargetT, e utilizou-se uma estratégia de vacinação com os constructos de ADN

referidos, em duas doses separadas de 1 semana, seguida após 10 dias de imunização com PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) em adjuvante completo de FREUND, para induzir EAE crónica em ratinhos SJL/J. Os resultados deste ensaio demonstraram eficácia da vacinação com o constructo de ADN codificando o minigene PLP139-151 na redução da gravidade da doença em comparação com controlos não vacinados, ou vacinados com plasmídeo vazio sem constructo. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas em relação ao atraso no início da doença (vacinação com ADN PLP139-151 11.5 ± 0.5 , $p < 0.008$ em relação ao controlo vacinado com plasmídeo vazio), no que diz respeito ao valor da pontuação EAE no pico na doença (vacinação com ADN PLP139-151 1.7 ± 0.4 , $p < 0.005$), ao valor médio da pontuação EAE (vacinação com ADN PLP139-151 0.9 ± 0.3 , $p < 0.0005$), e na incidência (vacinação com ADN PLP139-151 60% incidência *vs.* controlo pTarget 90% incidência). A utilização de constructos codificando o epítopo PLP178-191, ou o LPA PLP139-151 (L/R) também demonstrou eficácia, sobretudo para o epítopo PLP178-191, e menos para o LPA utilizado, nas mesmas medidas de avaliação clínica (10).

A avaliação da resposta imune, nos animais vacinados com o constructo de ADN PLP139-151, revelou mais dados sobre os processos imunológicos envolvidos na vacinação com ADN, e, potencialmente, sobre os seus mecanismos de acção. Após vacinação com o minigene referido, foi possível detectar por ELISA a presença de anticorpos anti-PLP139-151, significando que a vacinação com ADN foi capaz de induzir uma resposta linfocitária B. No que diz respeito à resposta T, animais vacinados com a vacina de ADN PLP139-151 e, depois, imunizados com o péptido cognato revelaram uma redução marcada na sua capacidade proliferativa contra este péptido. Testes de secreção de citocinas após estimulação *in vitro* também confirmaram uma redução na capacidade de secreção de IL-2 e IFN γ , após estimulação com o péptido PLP139-151. A avaliação da presença de citocinas no SNC de ratinhos SJL/J com EAE e vacinados com o constructo de ADN PLP139-151, de forma a avaliar a resposta imunitária no órgão-alvo desta doença, através de ensaios de protecção contra ribonucleases (*RNase*

protection assay), revelaram uma redução dos níveis de IFN γ e IL-15, mas não de outras citocinas, como IL-4 ou IL-10 (10). Na procura dos mecanismos responsáveis pela redução da capacidade proliferativa dos linfócitos T, realizaram-se ensaios *in vitro* com uma linha celular T anti-PLP139-151, na presença de células apresentadoras de antígeno e péptido PLP139-151, ou da vacina de ADN codificando PLP139-151, com e sem co-estimulação mediada por anticorpos anti-CD28. Os resultados desta experiência demonstraram que, mesmo na presença de anti-CD28, a linha celular anti-PLP não prolifera normalmente na presença da vacina de ADN em contraste com a proliferação contra o péptido, e que os efeitos supressores sobre a proliferação não são devidos à presença do ADN de plasmídeo, uma vez que a resposta proliferativa é mantida na presença de anti-CD28 (10).

Em conclusão, os resultados da vacinação com o constructo de ADN PLP139-151 pareciam implicar a capacidade co-estimuladora das APC como o principal mecanismo da supressão da proliferação dos linfócitos T. Na tentativa de confirmar essa hipótese, os autores avaliaram, *in vitro*, a capacidade co-estimuladora de APC na presença da vacina de ADN. Esplenócitos totais foram incubados com o ADN PLP139-151 durante 24 horas, e a presença de moléculas co-estimuladoras avaliada por citometria de fluxo. Os resultados desta experiência mostraram que na presença de ADN, células Mac-1+ (CD11b+) elevam a expressão de CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), mas que células B220+ (CD45R+) não só não aumentam a expressão de CD80, mas também reduzem a expressão de CD86 (10).

No seu conjunto, estes dados preliminares, obtidos por dois grupos distintos, respeitantes aos mecanismos de acção de vacinas de ADN codificadoras de proteínas do *self*, confirmaram que a resposta imune contra antígenos de mielina, no contexto da EAE, podia ser modificada quantitativa e qualitativamente através de vacinações com constructos de ADN, contendo as sequências imunodominantes desses mesmos antígenos (6, 10). Não só foi demonstrada a eficácia clínica da vacinação com ADN na prevenção da EAE, em dois modelos diferentes (EAE aguda induzida em

ratos Lewis, e EAE crónica induzida em ratinhos SJL/J), mas também alguns mecanismos desta resposta imune foram esclarecidos. Demonstrou-se uma redução da resposta proliferativa T contra o antigénio de mielina no modelo EAE em ratinhos SJL/J mas não em ratos Lewis; em ambos os casos, a secreção de citocinas Th1 (IFN γ) foi reduzida. A produção de anticorpos anti-mielina foi reduzida no caso da vacinação com MBP68-85, mas não foi avaliada no modelo de EAE crónica em SJL/J, no qual apenas se demonstrou que a vacina contendo o minigene PLP139-151 conseguia induzir anticorpos contra este antigénio. Por último, demonstraram-se alterações na relação co-estimuladora entre APC e linfócitos T, sobretudo à custa de modificações nas moléculas da família B7 nas APC.

As questões que nos propusemos estudar, baseados nestes dados preliminares, relacionaram-se com: a) esclarecimento dos mecanismos de acção da vacinação com ADN codificador de proteínas do *self* ; b) estratégias de co-vacinação utilizando constructos de ADN codificadores de citocinas de forma a modificar a resposta imune de forma benéfica; c) utilização de vacinas de ADN no tratamento de EAE estabelecida, e não só na prevenção de EAE, ou seja, numa situação comparável à sua utilização como tratamento em doentes com EM; d) estudo da resposta imune linfocitária T e B em detalhe; e) o papel de sequências imunoestimuladoras presentes no ADN bacteriano.

A possibilidade de utilização de co-vacinação com genes de citocinas havia já sido abordada, no contexto da vacinação com ADN para o tratamento do cancro ou de doenças infecciosas, com resultantes melhorias na indução de respostas imunes. A vacinação com ADN codificador de citocinas tinha sido tentada apenas uma vez no modelo de EAE monofásica em ratos Lewis, tendo sido testadas as citocinas IL-4, IL-10, GM-CSF e TNF (11). Os resultados destas experiências revelaram que a co-administração de vacinas de ADN codificadoras de citocinas, e de ADN de proteínas do *self* (neste caso um constructo de fusão entre 7 repetições em *tandem* da sequência MBP68-85 com o domínio de ligação à IgG da proteína estafilocócica A), eliminou parcialmente o efeito protector da vacina MBP68-

85, exceptuando com a utilização da vacina GM-CSF, que manteve idênticos níveis de protecção. Neste caso, não foi testado o efeito da administração de constructos de citocinas sobre a resposta imune, i.e., não foram testadas as respostas linfocitárias T ou B; com base nos seus resultados, estes autores postularam que a existência de um microambiente Th1 local seria necessário para o efeito protector da vacina MBP68-85, e que a administração de vacinas codificadoras de citocinas Th2 seria, como tal, deletéria (revisto em detalhe na Discussão).

2. Vacinação com ADN codificador de epítomos da proteína MOG para a prevenção de EAE crónica em ratinhos C57BL/6.

No início das nossas experiências, tentámos reproduzir o efeito clínico da vacinação com ADN codificador de proteínas do *self* no modelo de EAE crónica induzida por MOG35-55 em ratinhos C57BL/6, uma vez que todos os dados que possuíamos anteriormente eram respeitantes ao modelo de EAE em ratinhos SJL/J. Para tal, clonámos o gene MOG completo, e a sequência MOG35-55 de ratinho, para o vector de expressão mamífero utilizado nas experiências iniciais (pTargeT, Promega, Madison, WI). O gene MOG foi clonado utilizando uma reacção de polimerização em cadeia (PCR *Polymerase Chain Reaction*) a partir de um *template* de cérebro de ratinho e *primers* específicos de sequência (conforme detalhado no Capítulo VI); o minigene MOG35-55 foi subclonado a partir da sequência MOG, utilizando *primers* específicos de sequência (Figura 1). Ambos os constructos foram sequenciados para confirmação da sua identidade, tendo sido criados *stocks* bacterianos, a partir dos quais foram feitas culturas em grande volume para produção em massa das vacinas de ADN (Figura 1).

Numa experiência inicial, utilizámos a vacina com a sequência completa da proteína MOG para prevenção da EAE induzida em ratinhos C57BL/6; no dia 17 e 10 antes da indução da doença, os animais foram vacinados, intramuscularmente, na região gemelar das patas traseiras com

100 µg de ADN do constructo MOG, plasmídeo vazio, ou somente com o

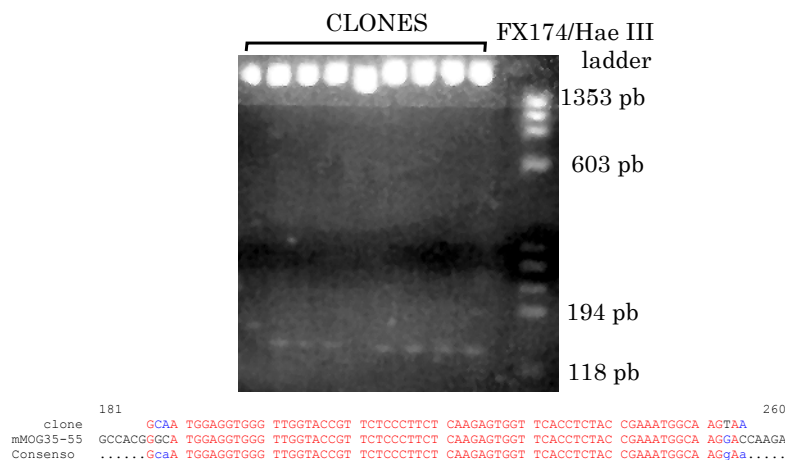


Figura 1. Clonagem do minigene MOG35-55 para o vector de expressão mamífero pTargeT. O minigene MOG35-55 foi clonado a partir da sequência do gene MOG através de RPC utilizando *primers* específicos de sequência, e integrado no plasmídeo pTargeT através de reacção de ligação T-A. Após selecção de colónias que demonstraram integração de plasmídeo, foi extraído ADN e submetido a reacção de digestão com a enzima de restrição EcoR I para demonstração da presença do constructo de ADN. O produto de digestão foi analisado através de electroforese em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio, sendo detectável a presença de uma banda de peso molecular correcto (tamanho previsto do produto de digestão 143 pares de bases – pb) por comparação com marcador de peso molecular. Em baixo está representada a sequência obtida a partir de um dos clones examinados, e que corresponde ao péptido MOG35-55 (incluindo o codão de iniciação ATG e terminação TAA).

veículo de solução. De forma a aumentar a eficácia da vacinação (e segundo o protocolo habitual de vacinação intramuscular com ADN), os animais tinham sido inoculados no local de vacinação, 48 horas antes, com uma solução de 0.25% bupivacaína (50 µl/membro), de forma a induzir regeneração muscular e inflamação. A análise dos cursos clínicos após indução de doença nesta experiência confirmou que a vacinação com o constructo MOG resultou numa redução da gravidade da EAE e atraso do seu início, e numa redução de incidência, em comparação com os dois grupos de controlo presentes (Figura 2, tabela anexa). Igualmente, em comparação com a administração de veículo, a vacinação com o vector pTargeT vazio resultou num agravamento da gravidade da doença, sobretudo se comparada com a administração do vector com o constructo MOG presente. A avaliação da capacidade de produção de citocinas, por células do sistema imune, foi

feita a partir de culturas de esplenócitos totais, após estimulação com o péptido indutor (MOG35-55) e controlos. Os resultados desta experiência revelaram que a vacinação com o constructo MOG levou a uma redução da produção de IL-2 e IFN γ , e a um aumento considerável da produção de IL-10, em comparação com os grupos de controlo (Figura 3), i.e., o fenótipo celular foi modificado de Th1 para Th2 pela vacinação com MOG. Em comparação com os dados publicados anteriormente, demonstrou-se uma modificação do fenótipo Th pela vacinação com constructos de mielina utilizada para a prevenção da EAE.

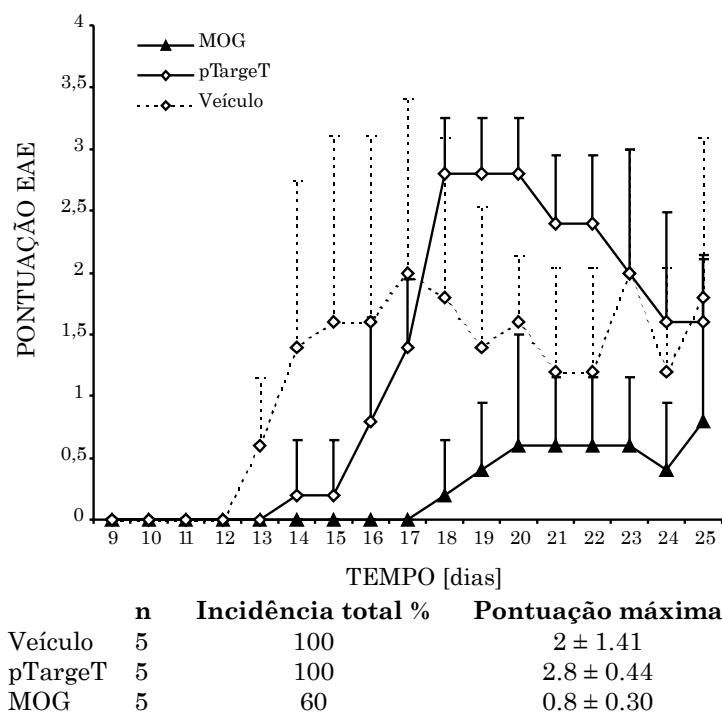


Figura 2. Prevenção de EAE crónica em ratinhos C57BL/6 através de vacinação com constructos de ADN codificando a proteína MOG. EAE foi induzida em ratinhos C57BL/6 por imunização com uma emulsão do péptido MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. em duas doses separadas de 48h a partir da imunização). Previamente, nos dias -10 e -17 antes da data de indução de doença, os ratinhos foram vacinados com 100 µg/ADN/i.m. (pTargeT ou MOG) ou receberam apenas veículo. As curvas mostradas representam a média das pontuações clínicas para cada grupo+desvio padrão (veículo n=5; pTargeT n=5; MOG n=5). Na tabela anexa estão mostrados os valores de incidência total e pontuação máxima atingida (média ± desvio padrão) para cada grupo.

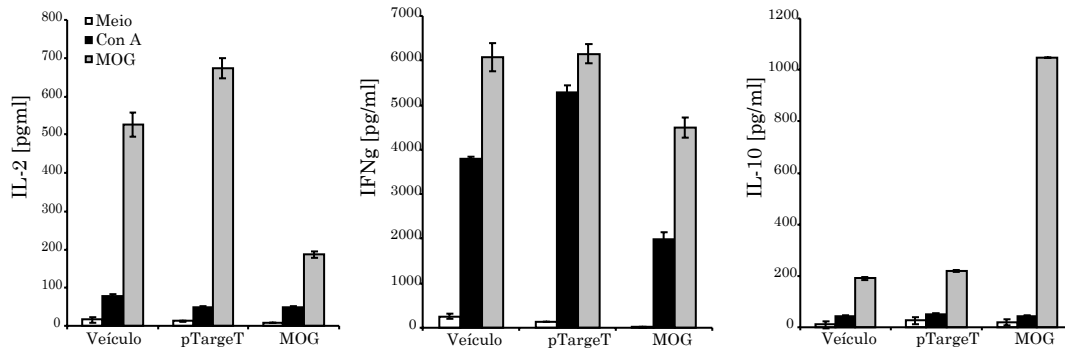
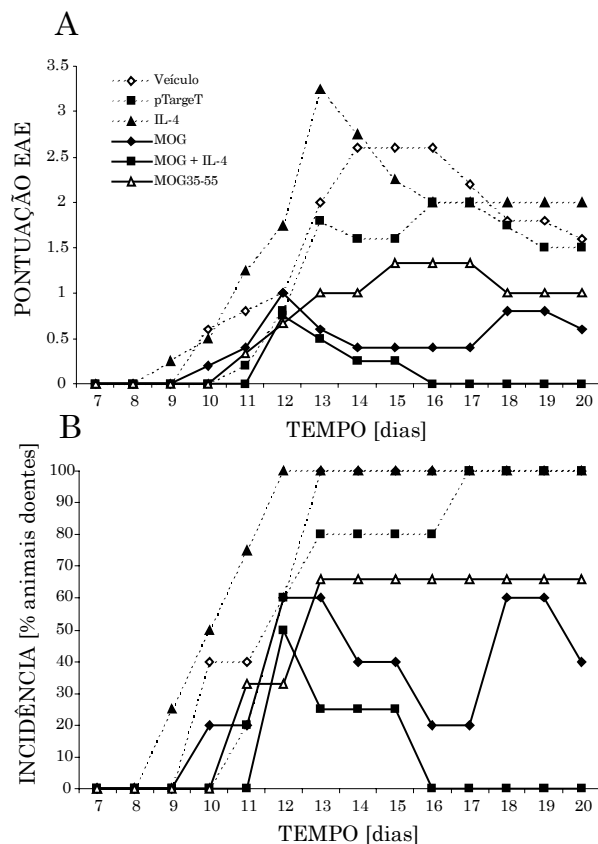


Figura 3. Produção de citocinas após vacinação preventiva com ADN. Ensaio de produção de citocinas a partir de esplenócitos de ratinhos C57BL/6 vacinados com constructos de ADN para MOG, vector vazio (pTargetT) ou veículo, e com EAE induzida com MOG35-55 e PTX. No final da experiência (dia 25), os baços dos ratinhos C57BL/6 (n=5 para todos os grupos) foram retirados e culturas de esplenócitos estabelecidas *in vitro* (2.5×10^6 células/ml) na presença do péptido cognato (MOG35-55 10 µg/ml), concanavalina A (Con A 2 µg/ml) ou meio de cultura. Os sobrenadantes foram retirados ao fim de 48h de estimulação, e a presença de IL-2, IFNγ e IL-10 avaliada por ELISA. Os resultados mostrados representam a média ± desvio padrão de amostras duplicadas.

No seguimento destes resultados, realizámos uma experiência de comparação entre a vacinação com o gene completo da MOG e o minigene MOG35-55 na prevenção da EAE. Decidimos, igualmente, utilizar uma estratégia de co-vacinação, utilizando, para tal, uma vacina codificadora do gene para uma citocina Th2, a interleucina-4 (IL-4). Tal como anteriormente, ratinhos C57BL/6 foram induzidos com EAE por imunização com o péptido MOG35-55, tendo sido vacinados 17 e 10 dias antes da data de indução com 100 µg de ADN do constructo MOG, IL-4, MOG35-55, MOG e IL-4, plasmídeo vazio, ou veículo de solução sem ADN. Em comparação com a experiência anterior, voltámos a observar que a vacinação com MOG resulta numa melhoria da incidência e gravidade da EAE, relativamente aos dois grupos de controlo vacinados com vector vazio, ou somente com veículo (Figura 4 e 5A). A utilização da vacina codificadora de IL-4, isoladamente, resultou num agravamento surpreendente, no que diz respeito à severidade da doença, e também à taxa de mortalidade (Figura 4 e 5B); este resultado parecia estar de acordo com o reportado por LOBELL *et al.*, (11) uma vez que a administração de uma vacina de citocina Th2 também resultou num

agravamento da EAE nas suas experiências. No entanto, e de forma quase



	n	Incidência total %	Pontuação máxima	Taxa mortalidade %
Veículo	5	100	2.6 ± 0.55	0
pTargeT	5	100	2 ± 0.82	0
IL-4	4	100	3.25 ± 1.25	25
MOG	5	60	0.8 ± 0.84	0
MOG+IL-4	4	50	0.8 ± 0.96	0
MOG35-55	3	66	1.3 ± 1.53	0

Figura 4. Prevenção de EAE em ratinhos C57BL/6 por vacinação com vacinas de ADN codificando epítomos da proteína MOG. EAE foi induzida em ratinhos C57BL/6 por imunização com uma emulsão do péptido MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. em duas doses separadas de 48h a partir da imunização). Previamente, nos dias -10 e -17 antes da data de indução de doença, os ratinhos foram vacinados com 100 µg/ADN/i.m. (pTargeT, IL-4, MOG35-55, MOG ou MOG+IL-4) ou receberam apenas veículo. As curvas mostradas representam a média das pontuações clínicas para cada grupo (A) e a incidência ao longo da experiência (B). Na tabela anexa, estão mostrados os valores de incidência total máxima (%), pontuação máxima atingida (média ± desvio padrão) e taxa de mortalidade cumulativa (%) para cada grupo.

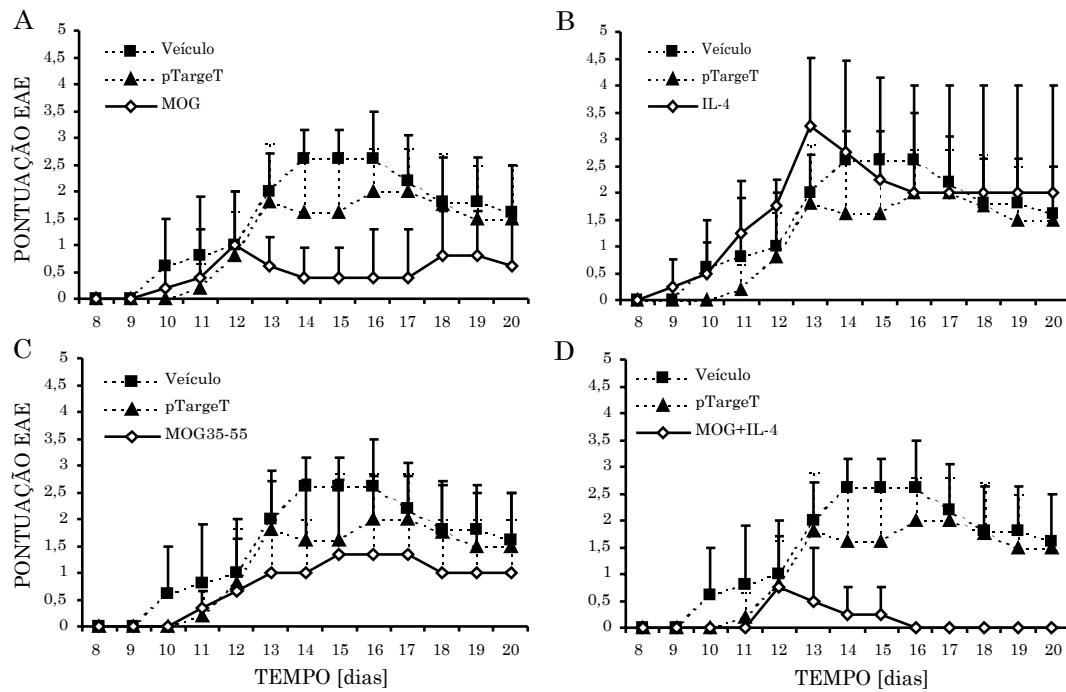


Figura 5. Prevenção de EAE crônica em ratinhos C57BL/6 por vacinação com constructos de ADN codificando epítomos da proteína MOG. Gráficos parcelares de comparação das pontuações dos vários grupos (A – MOG; B – IL-4; C – MOG35-55; D – MOG+IL-4) vacinados com constructos de ADN 17 e 10 dias (100 µg de ADN/animal/i.m.) antes da indução de EAE com MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. duas doses separadas de 48 horas a partir da imunização). As curvas de evolução clínica mostradas representam a média das pontuações EAE+desvio padrão para cada grupo (veículo n=5; pTargeT n=5; IL-4 n=5; MOG n=5; MOG35-55 n=4; MOG+IL-4 n=4).

paradoxal, a combinação destas duas vacinas – MOG e IL-4 – teve o melhor efeito na prevenção da EAE; não só a incidência mais baixa, mas sobretudo a melhor recuperação depois da fase aguda da doença, com todos os animais a ficarem completamente sãos depois do dia 16 (Figura 4 e 5D). Por último, a utilização da vacina de MOG35-55 (Figura 4 e 5C) demonstrou um efeito parcial de protecção, não significativo, embora o pequeno número de animais utilizados não permita tirar conclusões definitivas, somente a partir desta experiência. A análise da capacidade proliferativa dos linfócitos no final da experiência demonstrou que, ao contrário do observado para o modelo de EAE em ratinhos SJL/J, não era possível demonstrar supressão da proliferação com a utilização de nenhuma das vacinas isoladamente, a não

ser no grupo que recebeu a combinação MOG e IL-4, no qual se demonstrou uma supressão completa da proliferação (Figura 6^f).

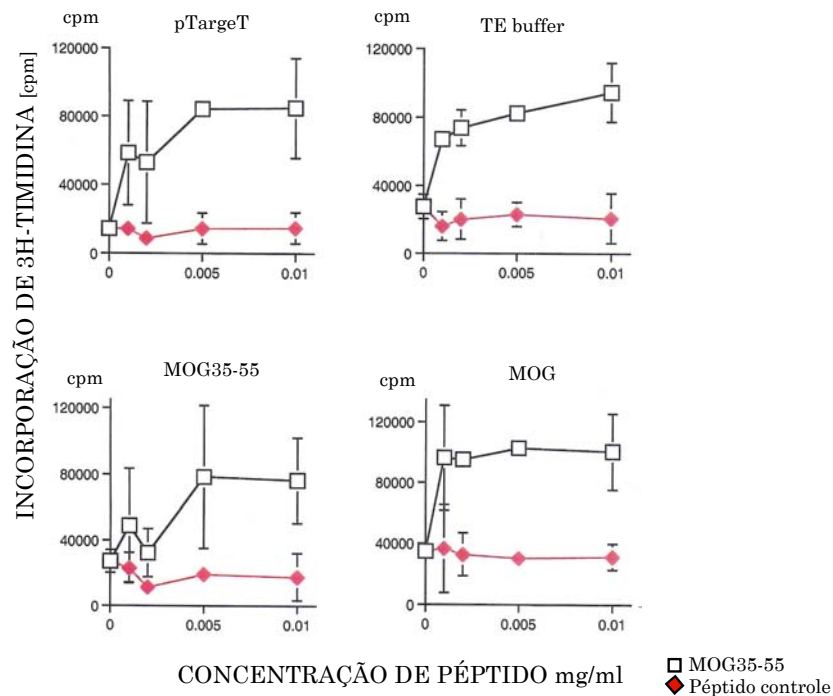


Figura 6. Proliferação linfocitária após vacinação com ADN. Ensaio de proliferação linfocitária em ratinhos C57BL/6 vacinados com constructos de ADN para a proteína MOG e IL-4, e com EAE induzida por imunização com o péptido MOG35-55 e PTX. No dia 20 pós-indução, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas e ensaios de proliferação realizados contra o péptido MOG35-55 e controlo (HSVP16) em concentrações crescentes, e concanavalina A (Con A). Resultados mostrados são contagens médias por minuto (cpm) \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

No que diz respeito à produção de citocinas e fenótipo linfocitário, testámos a capacidade de secreção *in vitro* das citocinas IL-2, IFN γ e IL-4 na presença do péptido utilizado para indução da EAE, por parte de esplenócitos dos diversos grupos experimentais. Como se pode observar (Figura 7A-C), a vacinação com os constructos de ADN para MOG levou a uma redução da secreção de IL-2 e IFN γ , e a um aumento da secreção de IL-4, em comparação com os dois grupos de controlo anteriormente mencionados; a utilização da vacina com o minigene MOG35-55 teve um

^f Os dados de proliferação mostrados são cortesia de Pedro J. Ruiz, a quem endereçamos os nossos agradecimentos.

efeito idêntico na produção de IL-2 e IFN γ , mas menor na produção de IL-4. A combinação de vacinas para MOG e IL-4, por sua vez, levou à maior redução da produção de IL-2 de todos os grupos de tratamento, e a uma redução da produção de IFN γ e aumento de IL-4, comparável ao do tratamento com MOG. Inesperadamente, a utilização isolada da vacina IL-4 resultou num aumento considerável da produção de IL-2, bem como em níveis de IFN γ superiores a todos os outros grupos vacinados, inclusivamente em comparação com o grupo de controlo com vector vazio. Outra forma de analisar os resultados desta experiência é através comparação da produção de citocinas Th1 e Th2, fazendo para isso uma razão simples entre os valores para as duas. Neste caso (Figura 7D), as razões Th1/Th2 demonstram uma correlação com a eficácia da vacinação; o grupo de controlo com administração de veículo (sem tratamento) apresenta o maior valor Th1/Th2; o tratamento com vector vazio ou IL-4 resulta numa redução parcial do valor da razão, e nos três grupos de tratamento com vacinas codificadoras de MOG há uma redução ainda mais acentuada do valor Th1/Th2, quase para os valores encontrados para o péptido de controlo.

No seu conjunto, os resultados destas experiências confirmaram a capacidade de prevenção da EAE em ratinhos C57BL/6 induzidos com MOG35-55, através da utilização de vacinas codificadoras de epítomos MOG, juntando, portanto, este modelo de EAE crónica aos dois modelos anteriormente utilizados (EAE monofásica em ratos Lewis e EAE crónica com surtos em ratinhos SJJ/J). Embora não tivesse sido possível confirmar o efeito da vacinação sobre a capacidade proliferativa linfocitária, foi revelado um efeito terapêutico de modificação de fenótipo Th, com a utilização de vacinas de ADN a resultar num fenótipo Th2 em ensaios *in vitro*. Por último, a utilização de co-vacinação com o gene MOG e IL-4 teve um efeito terapêutico muito positivo neste modelo, resultando numa melhoria significativa da eficácia da vacinação, na prevenção da gravidade e incidência da doença, e também na recuperação pós-surto. Pelo contrário, a utilização isolada da vacina IL-4 não só não demonstrou eficácia, como foi

evidenciada uma tendência para o agravamento do fenótipo clínico e um aumento da produção de citocinas Th1.

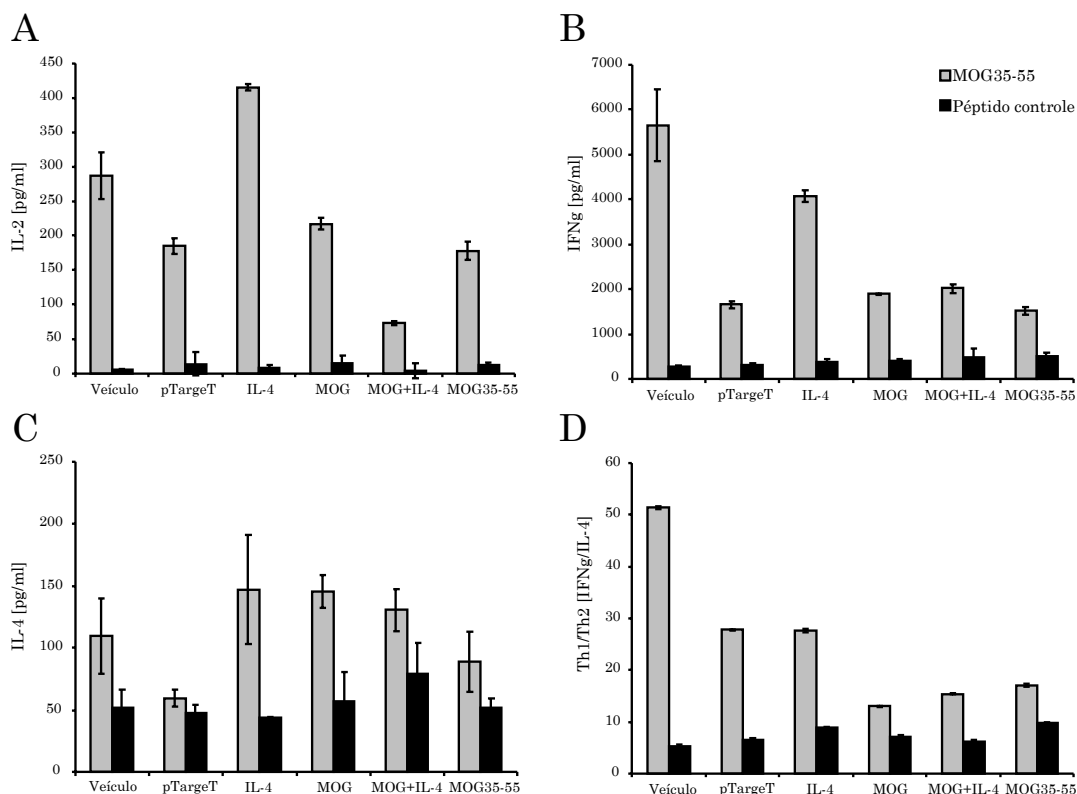


Figura 7. Produção de citocinas após vacinação com ADN. Ensaio de produção de citocinas em ratinhos C57BL/6 vacinados com constructos de ADN para a proteína MOG e IL-4, e com EAE induzida por imunização com o péptido MOG35-55 e PTX. No dia 20 pós-indução, os baços foram retirados, culturas de esplenócitos totais estabelecidas *in vitro*, e a produção de citocinas testada após estimulação com o péptido cognato (MOG35-55 10 µg/ml) ou controlo (HSVP16 10 µg/ml). Ao fim de 48 horas de estimulação, os sobrenadantes de cultura foram retirados, e a presença de citocinas testada por método ELISA. Os resultados mostrados representam a média ± DP de amostras triplicadas para IL-2 (A), IFNγ (B) e IL-4 (C), bem como a razão Th1/Th2 (IFNγ/IL-4) (D).

3. Mecanismos de acção da vacina codificadora de IL-4[‡].

De forma a esclarecer o mecanismo de acção da vacina IL-4, e de confirmar a sua eficácia, decidimos realizar um conjunto de experiências *in vitro*, destinadas a avaliar pormenorizadamente os seus efeitos a nível

[‡] Os resultados deste conjunto de experiências (pontos 2, 3, 4, 5) resultam de um trabalho de colaboração e encontram-se publicados [12]. Agradecemos a Hideki Garren a permissão para utilizar estes dados.

celular. A vacina IL-4 tinha sido clonada por PCR a partir de ADNc de baço de ratinho, e integrada no vector de expressão mamífero pTargetT, conforme descrito. De forma a demonstrar que a vacina codificadora de IL-4 era capaz de produzir proteína IL-4 de características normais, utilizamos um sistema de transcrição *in vitro*. Quando o vector contendo a sequência IL-4 foi transcrito e traduzido *in vitro* na presença de [³⁵S]-metionina, e o produto analisado por electroforese em gel de poliacrilamida e sódio-dodecil sulfato (SDS-PAGE), seguido de autorradiografia, um único produto do tamanho correcto para a proteína IL-4 de ratinho pôde ser observado (Figura 8A). Reacções de controlo com vector vazio sem constructo, ou com a vacina codificadora de PLP139-151 não revelaram a presença de qualquer produto (o produto da sequência PLP139-151 teria um peso molecular aproximado de 1.5 kD, e portanto seria muito difícil de visualizar por electroforese).

Colocando a hipótese, baseada nestes resultados e no que está descrito na literatura em relação à vacinação com ADN como forma de terapia génica, de que a vacina IL-4 pudesse actuar como forma de administração local da proteína IL-4 (i.e., que a vacina pudesse ser traduzida em IL-4 e esta proteína segregada em forma funcional), decidimos testá-la procurando os efeitos fisiológicos que pudesse ter localmente. A IL-4 actua num receptor próprio e induz efeitos intracelulares por sinalização através de vários mediadores, e especificamente através da proteína STAT6, membro da família de proteínas tradutoras e activadoras de sinais de transcrição (13-15). De forma a testar os efeitos funcionais da vacinação com o ADNc para IL-4, vacinámos ratinhos S/JL/J intramuscularmente com este constructo com periodicidade semanal, e retirámos os gânglios linfáticos de drenagem da região injectada, uma semana depois da administração da última dose de ADN. Fizemos lisados de proteína total a partir dos linfócitos periféricos extraídos dos gânglios, e testámos a presença de STAT6 activada através de *Western blotting*, utilizando um anticorpo policlonal específico para a forma activada (fosforilada) desta proteína. Como controlos utilizámos animais vacinados com vector vazio ou sem vacinação. Como se pode constatar (Figura 8B e C) somente no grupo vacinado com o constructo

IL-4 se pode observar a presença de uma banda de aproximadamente 60 kD, correspondendo à forma activada ou fosforilada de STAT6, enquanto que nos grupos de controlo esta não é visível. Obtivemos resultados idênticos numa experiência separada, na qual os animais foram vacinados diária e não semanalmente; os ratinhos receberam 3 doses de ADN em 3 dias seguidos, e os gânglios de drenagem foram retirados no dia seguinte à última dose de ADN. Tal como anteriormente, apenas no grupo vacinado com o constructo IL-4 se pôde observar a presença de activação da proteína STAT6.

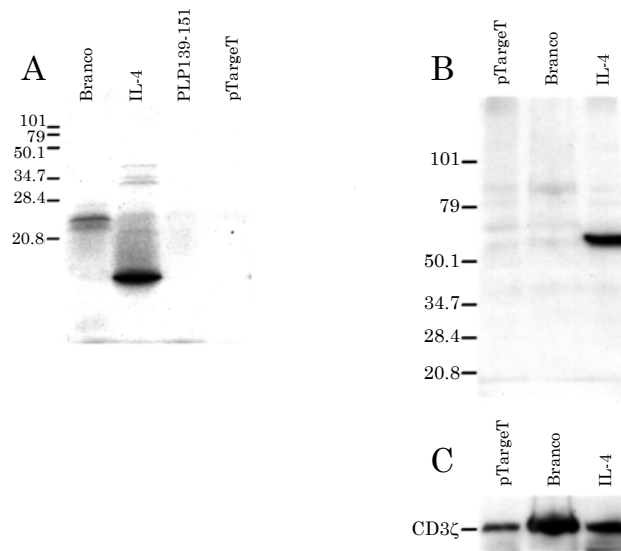


Figura 8. Mecanismos de acção da vacina com o constructo IL-4. A – Ensaio de transcrição *in vitro* a partir da vacina codificadora de IL-4, vacina PLP139-151, vector vazio (pTargetT) ou controlo negativo (branco), na presença de $[^{35}\text{S}]$ -metionina. Detecção de banda proteica com peso molecular correcto para a proteína IL-4, da vacina IL-4. Imagem de autorradiografia após electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). B – Western blot para a detecção da forma fosforilada da proteína STAT6. Lisados de proteína total foram obtidos a partir de linfócitos extraídos dos gânglios de drenagem de ratinhos vacinados com os constructos IL-4, vector vazio (pTargetT), ou controlo negativo (branco), e a presença de STAT6 fosforilada testada por anticorpo policlonal específico após electroforese em gel de poliacrilamida e *Western blotting*. Só se observa a presença C – *Western blot* para a detecção de CD3ζ como controlo positivo e de quantidade de proteína. Os resultados mostrados são representativos de dois *Western blots* realizados em duas experiências independentes. Os marcadores de peso molecular estão indicados em kilodaltons.

O conjunto destas experiências permitiu-nos concluir que, não só a vacina IL-4 tem a potencialidade de ser traduzida em proteína IL-4 de tamanho normal, mas também que, após vacinação com o constructo IL-4, há, localmente, uma transcrição e tradução desta vacina em IL-4 funcional, capaz de se ligar com o seu receptor específico e induzir sinalização, i.e., que a vacinação com o constructo IL-4 poderia actuar como forma de terapia génica local nos gânglios linfáticos de drenagem do local de vacinação.

4. Co-vacinação com o minigene PLP139-151 e IL-4 na prevenção da EAE crónica induzida em ratinhos SJL/J.

De forma a melhorar a protecção conferida pela vacinação com o minigene PLP139-151, no modelo de EAE crónica induzida em ratinhos SJL/J (como descrito em (10)), decidimos utilizar uma estratégia de co-vacinação com o constructo IL-4 em plasmídeos separados, tal como tínhamos feito para o modelo de EAE em C57BL/6. Utilizámos um protocolo de vacinação idêntico ao anteriormente descrito, em que os animais experimentais receberam duas doses de ADN (100 µg/animal/i.m.) separadas de 1 semana de intervalo, e precedidas 2 dias antes de injeção de bupivacaína no mesmo local. Dez dias após a última injeção de ADN, induzimos EAE por injeção subcutânea de uma emulsão do péptido PLP139-151. Os grupos de tratamento incluíam vacinações separadas com o constructo PLP139-151 ou IL-4, e um grupo de co-vacinação; os grupos de controlo incluíam um grupo não-vacinado, e outro apenas com plasmídeo vazio (Figura 9). Os resultados da avaliação clínica destes animais revelaram uma diminuição estatisticamente significativa da gravidade clínica da EAE, bem como da incidência, no grupo de co-vacinação comparado com os grupos de controlo não-vacinados, ou vacinados apenas com o vector vazio. Analisando os vários grupos de tratamento, pode-se observar que, nesta experiência, a eficácia da vacinação com PLP139-151

isolada não foi tão significativa como anteriormente reportado por RUIZ *et al.* (10), e, também, que, uma vez mais, a vacinação isolada com o constructo IL-4 levou a um agravamento do pico máximo de severidade da doença, tal como no modelo anterior.

Vacina ADN	n	Incidência %	Pontuação máxima	Pontuação dia 12	Pontuação dia 14	Pontuação dia 16
Não-vacinado	14	86	2.3 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.3
pTargetT	15	93	2.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.1 ± 0.2
IL-4	15	80	2.7 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2
PLP139-151	15	73	2.4 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3	0.5 ± 0.4
pTarget+PLP139-151	10	80	2.4 ± 0.3	1.8 ± 0.3	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.3
IL-4+PLP139-151	15	53	1.6 ± 0.3*	0.8 ± 0.3*	0.7 ± 0.3*	0.5 ± 0.2*

Figura 9. Prevenção da EAE induzida em ratinhos SJL/J por vacinação com ADN codificador de epítomos PLP e co-vacinação com o constructo IL-4. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com uma emulsão do péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) em ACF. Previamente, nos dias -17 e -10 antes da data de indução da doença, os ratinhos foram vacinados com 100 µg/ADN/i.m. (PLP139-151, IL-4, vector vazio pTargetT, combinação de PLP139-151 e IL-4 ou pTarget). Mostrados os valores de incidência total (%), pontuação máxima no pico da doença, e nos dias 12, 14 e 16 pós imunização (média ± desvio padrão). Assinalados com asterisco os valores estatisticamente significativos na comparação entre os grupos pTargetT e de co-vacinação PLP139-151+IL-4 (teste *t-Student* não emparelhado, valores $p < 0.038$, $p < 0.049$, $p < 0.008$ e $p < 0.041$, respectivamente para a pontuação máxima, dia 12, 14 e 16).

Uma vez que tínhamos postulado um efeito de terapia génica local, veiculado pela vacinação com o constructo IL-4, tentámos determinar se a utilização de um constructo em que tínhamos abolido a sequência sinal do gene IL-4, responsável pela sua secreção celular, era tão eficaz como a utilização do nosso constructo em que toda a sequência estava presente. A remoção da sequência sinal tornaria o produto de transcrição do constructo incapaz de ser processado pelos compartimentos intracelulares adequados, e, portanto, não resultaria numa molécula segregada e funcional. Após clonagem do constructo IL-4 sem sequência sinal, realizámos uma experiência de co-vacinação idêntica à anteriormente descrita com o minigene PLP139-151. Os resultados desta experiência (Figura 10) demonstraram que não é possível obter o mesmo grau de protecção contra a EAE utilizando a forma não-segregada do constructo de IL-4, em comparação com a forma secretória habitualmente utilizada. Tal resultado é compatível com a interpretação de que a eficácia da vacinação com IL-4 está

dependente não só da capacidade de transcrição de uma proteína de tamanho integral, mas também inequivocamente relacionada com a secreção dessa mesma proteína.

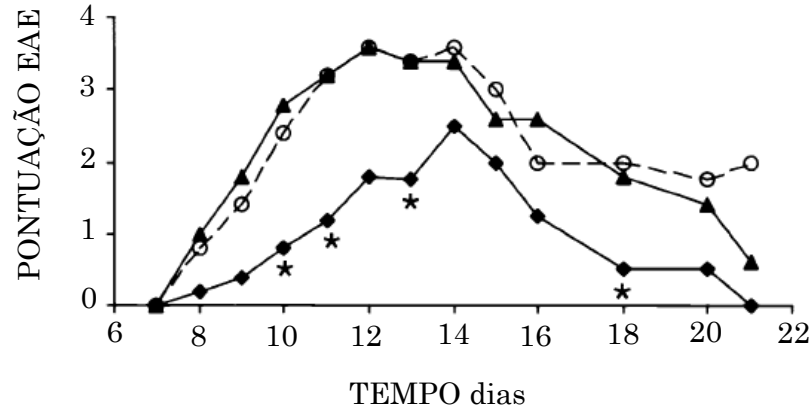


Figura 10. Comparação da utilização de vacinas com o constructo IL-4 com e sem sequência sinal. Constructos de ADN codificando a sequência completa da citocina IL-4, ou uma forma não-secretória sem a sequência sinal, foram clonadas e utilizadas para vacinar ratinhos SJL/J antes da indução de EAE com PLP139-151. Grupos de 5 ratinhos foram vacinados com o constructo IL-4 secretado e o minigene PLP139-151 (◆, linha cheia), constructo IL-4 não secretado e minigene PLP139-151 (▲, linha cheia) ou veículo de solução (○, linha tracejada). O gráfico representa a curva de evolução clínica para os três grupos (pontuação EAE média); estão assinalados com asterisco diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$ pelo teste *t-Student* não emparelhado) entre os grupos vacinados com o constructo secretado e não secretado.

De forma a avaliar eventuais modificações das funções linfocitárias T, após vacinação com o minigene isolado, ou co-vacinação com o constructo IL-4, retirámos os gânglios linfáticos periféricos de animais vacinados com o minigene PLP139-151 ou o gene IL-4, isoladamente ou em co-vacinação, com vector vazio ou não vacinados, e que tinham sido induzidos com EAE por imunização com o péptido PLP139-151. Estabelecemos culturas linfocitárias totais a partir destes gânglios, e testámos a capacidade proliferativa contra o péptido cognato; as mesmas culturas foram utilizadas para estabelecer linhas celulares T, que posteriormente testámos para a capacidade de secreção de citocinas. No que diz respeito à capacidade proliferativa, como se pode observar dos resultados obtidos (Figura 11), a vacinação isolada com o minigene PLP139-151 leva a uma supressão da capacidade proliferativa, tal como já havia sido reportado anteriormente

(10). Inversamente, a co-vacinação com o gene IL-4 não leva a uma supressão da proliferação, sendo os valores de incorporação de timidina tritiada encontrados semelhantes aos do grupo controlo vacinado com vector vazio. Estes resultados implicam que o mecanismo de protecção, neste modelo de EAE, pela co-vacinação com o minigene PLP e IL-4, não envolve a indução de anergia, tal como anteriormente postulado para a vacinação com minigene isolado, mas sim outro tipo de mecanismo fundamentalmente diferente.

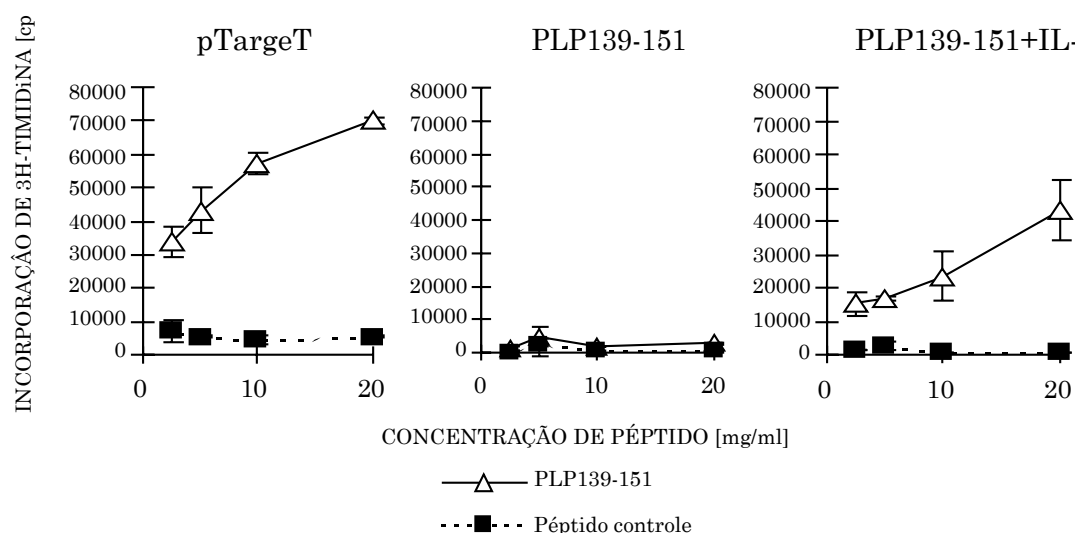


Figura 11. Capacidade proliferativa de linfócitos periféricos de ratinhos SJL/J vacinados com ADN codificando o epítipo PLP139-151 com e sem co-vacinação com o constructo IL-4. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com uma emulsão do péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) em ACF, e vacinados antes da indução com o minigene PLP139-151, co-vacinados com o minigene e o constructo IL-4, ou com vector vazio (pTarget) (100 µg/animal/i.m. em duas doses separadas de 1 semana, nos dias -17 e -10 antes da data de indução de doença). Após recuperação do pico agudo de doença, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas, e a capacidade proliferativa testada após estimulação com o péptido cognato (PLP139-151) ou controlo (HSVP16). Os resultados mostrados são a média das contagens por minuto (cpm) ± desvio padrão de amostras triplicadas. Os valores de estimulação com concanavalina A (cpm) foram de 34.206 para o grupo pTarget, 10.838 para o grupo PLP139-151 e 14.262 para o grupo PLP139-151+IL-4.

No que diz respeito ao fenótipo celular T, testámos a capacidade de produção de citocinas de linhas celulares T, estabelecidas a partir da mesma cultura linfocitária testada para proliferação. Para cada um dos grupos de tratamento anterior, linhas celulares T foram estimuladas *in vitro* com o

péptido utilizado para imunização (PLP139-151), e a produção das citocinas IFN γ , IL-4 e IL-10 medida por ELISA nos sobrenadantes de cultura. Como se pode observar da análise dos resultados obtidos (Figura 12), apenas no grupo co-vacinado com o minigene PLP e IL-4 se assistiu a uma modificação apreciável do fenótipo Th, em comparação com os grupos de controlo não vacinados, ou vacinados apenas com vector vazio, que apresentaram um fenótipo Th1 predominante. No grupo co-vacinado, não só houve uma redução muito significativa do valor de IFN γ segregado após estimulação (1389 ± 108 pg/ml *vs.* 6689 ± 85 pg/ml para o grupo pTargetT, $p < 0.0001$), mas também um aumento apreciável da secreção das citocinas IL-4 (716 ± 237 pg/ml *vs.* 0.208 ± 0.36 para o grupo pTargetT, $p < 0.0064$) e IL-10 (1073 ± 221 pg/ml *vs.* 464 ± 44 pg/ml para o grupo pTargetT, $p < 0.0151$). Este efeito não foi observável em nenhum dos outros grupos de tratamento, sendo que em nenhum deles houve reduções significativas da secreção de IFN γ , e aumentos pouco significativos na secreção de citocinas Th2.

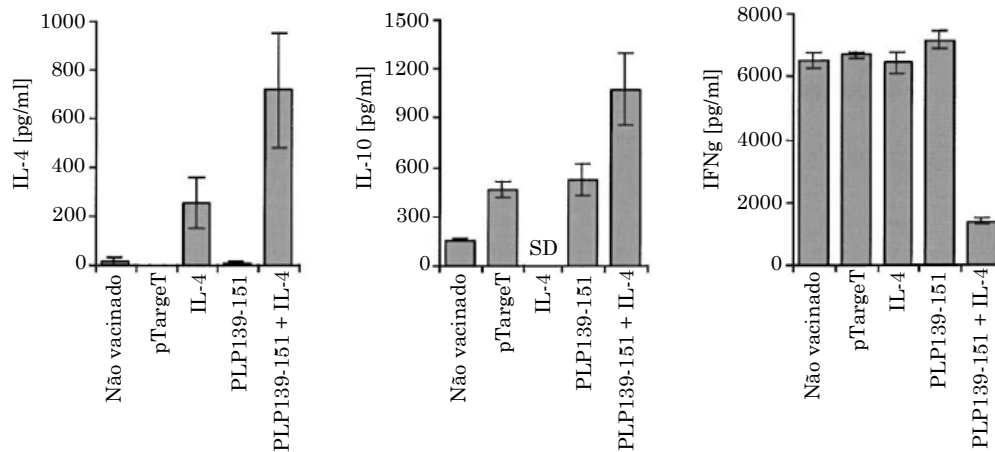


Figura 12. Ensaio de produção de citocinas por linhas celulares T de ratinhos SJL/J vacinados com ADN codificador de PLP139-151 e/ou IL-4. Ratinhos SJL/J foram vacinados com constructos de ADN codificadores do epítipo PLP139-151, IL-4, os dois conjuntamente, vector vazio (pTargetT), seguido de indução de EAE por imunização com o péptido PLP139-151 em ACF (100 μ g/animal/s.c.). Após dissecação dos gânglios linfáticos de drenagem, linhas celulares T foram estabelecidas, e a sua capacidade de produção das citocinas IL-4, IL-10 e IFN γ testada por ELISA após estimulação com o péptido imunizador (10 μ g/ml) *in vitro* durante 6 dias. Estão representados os valores médios \pm desvio padrão de amostras triplicadas; estes resultados são representativos de três experiências independentes (SD –sem dados disponíveis). A linha horizontal representa o grupo de vacinação a partir do qual a linha celular foi derivada.

Uma vez que a vacinação com o minigene PLP139-151 e IL-4, se mostrou capaz de gerar linhas celulares T com capacidade proliferativa contra o péptido indutor de doença, e com um fenótipo protector Th2, testámos a capacidade dessas linhas celulares transferirem protecção. Para tal, induzimos EAE em ratinhos SJL/J, e 8 dias depois da imunização (antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos de doença), transferimos endovenosamente 10 milhões de células T para cada animal experimental. Estas células tinham sido derivadas a partir da linha celulares T provenientes dos animais vacinados com a combinação de genes para PLP139-151 e IL-4, ou com uma linha celular T controlo com características encefalitogénicas reconhecidas (linha celular anti-PLP139-151). Os dois grupos de tratamento foram, posteriormente, seguidos para avaliação do curso clínico da doença. Como resultado desta transferência adoptiva de linfócitos T, observámos uma redução marcada na incidência (20% no grupo que recebeu células provenientes de animais vacinados *vs.* 80% no grupo controlo) bem como na gravidade da doença (Figura 13). O efeito terapêutico desta transferência celular foi particularmente impressionante na redução da incidência de EAE no grupo tratado, resultando numa protecção completa contra o aparecimento de sinais de doença em animais que tinham sido induzidos por imunização activa com péptido e adjuvante completo de FREUND e que, normalmente, deveriam ter ficado doentes.

No seu conjunto, estes resultados demonstraram que no modelo de EAE crónica em ratinhos SJL/J, a prevenção da doença provocada pela vacinação com os ADNc codificadores do minigene PLP139-151 e IL-4 não era devida à supressão da resposta celular T, mas sim à modificação do fenótipo Th. A vacinação com o minigene isoladamente permite apenas suprimir a proliferação dos linfócitos T contra o péptido imunizador; a co-vacinação com o constructo IL-4 não só é mais eficaz do ponto de vista clínico que a precedente, mas altera o fenótipo celular de linfócitos T específicos para o antígeno indutor, gerando linhas celulares com capacidade protectora, e que permitem transferir o efeito terapêutico para outros

animais, provavelmente por exercerem acções reguladoras ou supressoras sobre linfócitos T encefalitogénicos. Do ponto de vista terapêutico, como tal, a co-vacinação apresenta-se como uma alternativa muito mais vantajosa.

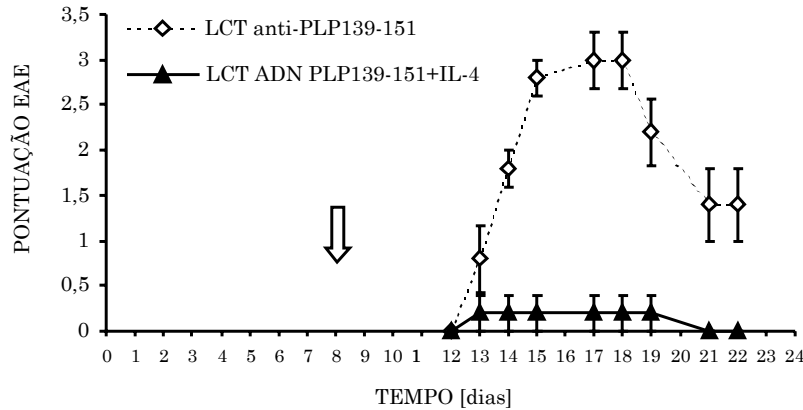


Figura 13. Protecção contra EAE induzida activamente pela transferência adoptiva de linhas celulares T. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com o péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) e ACF; 8 dias depois da imunização (seta branca), cada animal individual recebeu por transferência adoptiva linhas celulares T (LCT) anti-PLP139-151 ou LCT provenientes de ratinhos co-vacinados com o minigene PLP139-151 e o constructo IL-4 (1×10^6 células/animal/e.v., $n=5$ para ambos os grupos). Os resultados mostrados são a média da pontuação EAE para cada grupo \pm desvio padrão, e são representativos de duas experiências independentes.

5. Necessidade da presença de STAT6 para o efeito terapêutico da co-vacinação com o constructo IL-4.

De forma a confirmar que a vacina IL-4 actuava *in vivo* de acordo com o mecanismo postulado anteriormente (i.e. que após a sua administração, a vacina era transcrita em IL-4 funcional, e que esta proteína era segregada e actuava no seu receptor, de maneira a induzir uma modificação fenotípica T), decidimos avaliar o papel da sinalização com STAT6 no efeito terapêutico, e na capacidade de modificação fenotípica da vacina IL-4. Uma vez que a IL-4 depende da sinalização veiculada por pela STAT6 de forma a exercer os seus efeitos fisiológicos, na sua ausência estes são eliminados completamente. Obtivemos, para esse efeito, ratinhos *knockout* para a proteína STAT6 e realizámos experiências de vacinação com ADN comparáveis às anteriores. Infelizmente, os ratinhos STAT6^{-/-} estão

disponíveis apenas num *background* Balb/c; esta estirpe é notoriamente resistente à indução de EAE, embora possam ser encontradas linhas celulares T reactivas contra epítomos da proteína MBP em ratinhos Balb/c imunizados com MBP de cobaio (16). Estas contingências levaram a que fosse apenas possível avaliar o efeito sobre a modificação fenotípica de linhas celulares T anti-MBP, e não o efeito terapêutico concreto sobre a indução de EAE. Vacinámos ratinhos Balb/c controlo e STAT6^{-/-}, utilizando o mesmo protocolo que descrevemos anteriormente, com vacinas codificadoras da sequência completa da MBP, IL-4 ou uma combinação das duas. Os animais foram de seguida imunizados com uma emulsão de MBP de cobaio em ACF, e 10 dias depois os gânglios linfáticos de drenagem foram retirados, culturas linfocitárias estabelecidas, e o fenótipo Th determinado pelo perfil de secreção de citocinas Th1 e Th2, após estimulação com péptidos derivados da MBP. Nesta experiência, a co-vacinação com os constructos de MBP e IL-4 levou a uma maior polarização Th2, em comparação com a vacinação com qualquer das vacinas isoladamente, ou com o grupo não vacinado (Figura 14). Este efeito foi parcialmente eliminado pela deleção da proteína STAT6, tal como seria de esperar se esta fosse importante para a mediação dos efeitos terapêuticos da vacina IL-4. Em conclusão, julgamos que os dados apresentados suportam a afirmação de que a vacinação com o ADNc do gene para a IL-4 leva à produção e secreção local, nos gânglios linfáticos de drenagem do local de injeção, de IL-4 funcional, que estimula o seu receptor nos linfócitos T, levando à sua polarização fenotípica para Th2, através de sinalização intracelular mediada pela proteína STAT6.

Estirpe	Vacina de ADN	IL-4 (pg/ml)	IFN γ (pg/ml)	Razão Th2/Th1
Balb/c	Nenhuma	57.3	573.9	0.1
Balb/c	MBP	11.3	101.1	0.11
Balb/c	IL-4	88.2	291.7	0.3
Balb/c	MBP+IL-4	276.4	145.8	1.9
STAT6 ^{-/-}	Nenhuma	70.2	106.7	0.65
STAT6 ^{-/-}	MBP+IL-4	123.8	110	1.13

Figura 14. Influência da STAT6 no mecanismo de acção da vacina IL-4. Ensaio de produção de citocinas por linfócitos de ratinhos Balb/c e STAT6^{-/-} imunizados com MBP de

cobaio e previamente vacinados com ADN codificador de MBP e IL-4. Ratinhos STAT6 -/- e controles Balb/c normais foram imunizados com uma emulsão de MBP de cobaio em ACF (100 µg/animal/s.c.) e previamente vacinados com constructos de MBP e IL-4, isolados e em combinação (100 µg/animal/i.m. nos dias -17 e -10 a partir da data de imunização). No dia 10 pós-imunização, os gânglios periféricos foram retirados, e um ensaio de ELISA por captura estabelecido conforme descrito nos Materiais e Métodos, para detecção de IL-4 e IFN γ após estimulação com o péptido MBP59-76 (10 µg/ml). Os resultados mostrados são a concentração de IL-4, IFN γ e a razão Th2/Th1 (concentração de IL-4/IFN γ) para cada grupo (n=2 para cada grupo).

6. Tratamento da EAE estabelecida através de co-vacinação com constructos de ADN codificadores de MOG e IL-4.

Todas as experiências descritas anteriormente, e reportadas na literatura, referem-se à utilização de vacinas de ADN na prevenção da EAE, utilizando estratégias de vacinação nas quais a administração dos constructos de ADN precede a indução de doença. Embora sendo, sem dúvida, importantes como forma de estabelecer o paradigma de imunização e provar o conceito da utilidade desta tecnologia, tal como na compreensão dos mecanismos de acção das vacinas, as experiências de prevenção de EAE não são aplicáveis, por motivos evidentes, à realidade clínica das doenças desmielinizantes humanas, como a Esclerose Múltipla. Como tal, decidimos explorar a questão da eficácia da vacinação com ADN no tratamento de formas de EAE estabelecidas. Para esse efeito, resolvemos tentar o tratamento da EAE estabelecida em ratinhos C57BL/6 com o constructo de ADN para a MOG, o principal auto-antígeno de mielina envolvido na indução de doença nesta estirpe (conforme revisto no Capítulo I).

Uma vez que vários autores têm atribuído a progressão da doença, e a ocorrência de surtos, ao alargamento da resposta imune para outros epítomos dentro da mesma e outras proteínas de mielina – diversificação de epítomos – (17-19), e também pelos dados de eficácia (acima descritos) para a prevenção da EAE, comparando a vacina MOG com o minigene MOG35-55, decidimos usar a vacina de ADN codificadora da sequência completa da proteína MOG. Desta maneira, pretendemos reduzir as possibilidades de diversificação da resposta imune para outros antígenos de mielina dentro da mesma molécula.

Induzimos EAE em ratinhos C57BL/6 com o protocolo de imunização habitualmente utilizado (imunização subcutânea com uma emulsão do péptido MOG35-55 em adjuvante completo de FREUND e administração endovenosa de *pertussis*), e esperamos pelo aparecimento de sinais clínicos de doença. Nessa altura, os animais foram randomizados pelos grupos de tratamento de forma a todos terem a mesma gravidade média de doença e o mesmo número de animais doentes. Os grupos de tratamento consistiram da administração isolada das vacinas MOG e IL-4, co-vacinação com estes dois constructos, ou administração de vector vazio. Como se pode observar (Figura 15, tabela anexa), a reversão da EAE estabelecida só é possível pela co-administração das vacinas MOG e IL-4, enquanto que a administração isolada de qualquer destas vacinas não demonstrou qualquer eficácia. Os efeitos terapêuticos desta combinação são visíveis no que diz respeito a gravidade da doença (com diferenças estatisticamente significativas da pontuação EAE média em vários dias a seguir à administração de ADN), e à recuperação após o surto inicial, com uma redução apreciável da incidência de doença após a vacinação. Quando analisámos a capacidade proliferativa linfocitária, contra o péptido cognato, nos animais tratados com as vacinas IL-4, MOG e MOG+IL-4, não observámos diferenças significativas entre os três grupos, de acordo com o conceito de que a eficácia terapêutica das vacinas de ADN não está necessariamente relacionada com a supressão da capacidade proliferativa, mas provavelmente com a modificação das funções efectoras linfocitárias. Por outro lado, a capacidade de secreção de citocinas por parte dos linfócitos T foi modificada, com um aumento da secreção de IL-10 por parte dos grupos tratados com MOG e MOG+IL4 em comparação com o grupo IL-4, de acordo com uma mudança fenotípica para Th2 (Figura 16 e 17).

Estes resultados foram a primeira demonstração da eficácia terapêutica na reversão de EAE estabelecida, por oposição à prevenção desta doença, e, como tal, abriram a perspectiva da utilização desta forma de terapêutica antigénio-específica no tratamento das doenças desmielinizantes.

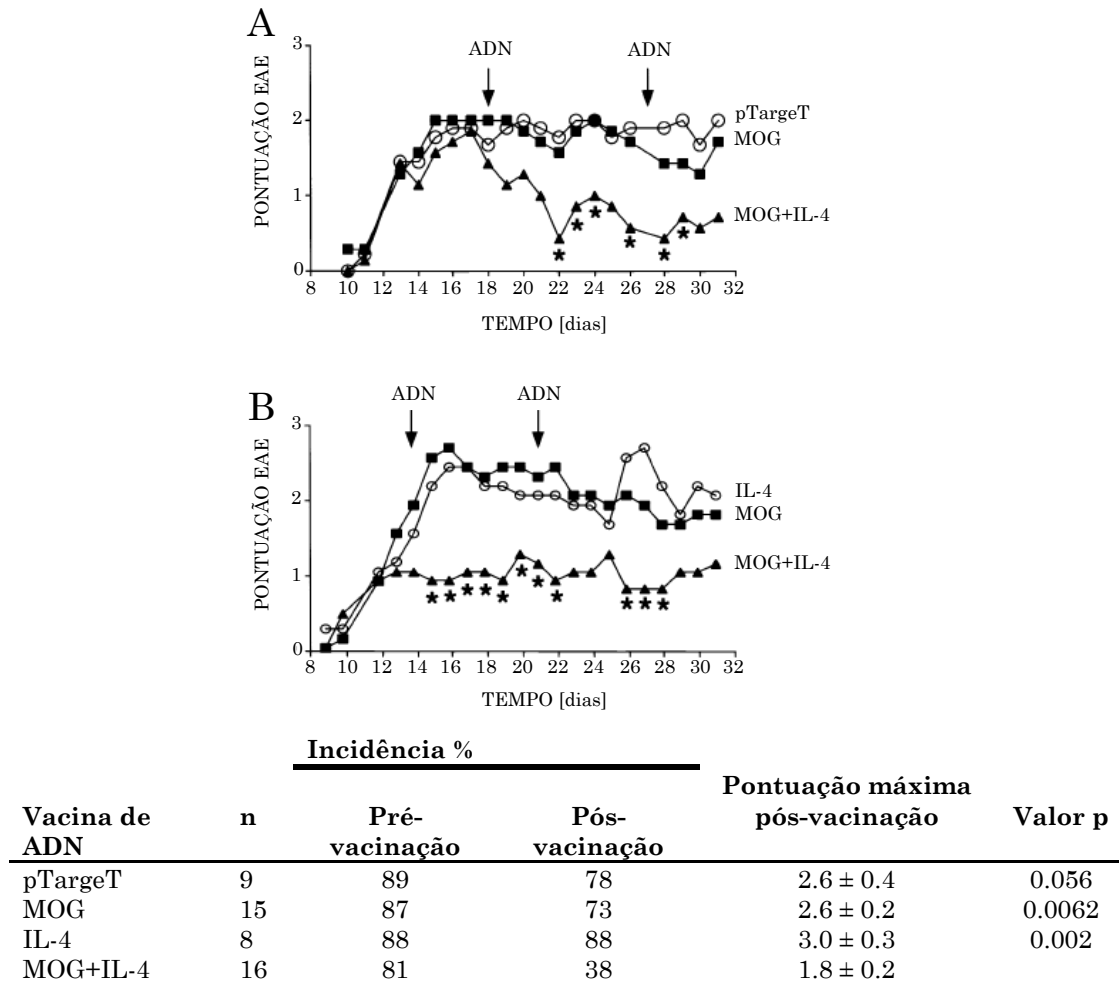


Figura 15. Tratamento da EAE aguda por co-vacinação de ADN em ratinhos C57BL/6. Ratinhos C57BL/6 foram induzidos com EAE por imunização com MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. duas doses com 48 horas de intervalo a partir da data de imunização). Após instalação de sinais clínicos de doença, os animais foram tratados com vacinas de ADN codificadoras de MOG e IL-4, isoladamente e em co-vacinação, ou vector vazio. A – Comparação entre co-vacinação com MOG e IL-4, MOG isolada ou vector vazio (pTargetT) (n=10 para todos os grupos). Duas doses de ADN (100 µg/animal/i.m.) foram administradas nos dias 18 e 27 (setas), após o pico da doença. B – Comparação entre a co-vacinação com MOG e IL-4, e cada uma destas vacinas isoladamente (n=8 para todos os grupos). Duas doses de ADN (100 µg/animal/i.m.) foram administradas nos dias 14 e 21 (setas), durante o pico da doença. Os resultados mostrados são respeitantes a duas experiências independentes, e correspondem à pontuação média diária ao longo do tempo. Assinalados com asteriscos os dias com diferenças estatisticamente significativas (p<0.05 por teste t-Student não emparelhado) entre o grupo co-vacinação e o controlo. Na tabela anexa estão mostrados os valores da incidência (%) antes e depois da vacinação com ADN, pontuação máxima pós-vacinação (média ± desvio padrão) e comparação estatística desta pontuação entre o grupo MOG+IL-4 e todos os outros grupos de tratamento (valor p, teste t-Student emparelhado). Os valores resultam da combinação de dados entre as duas experiências de tratamento mostradas acima.

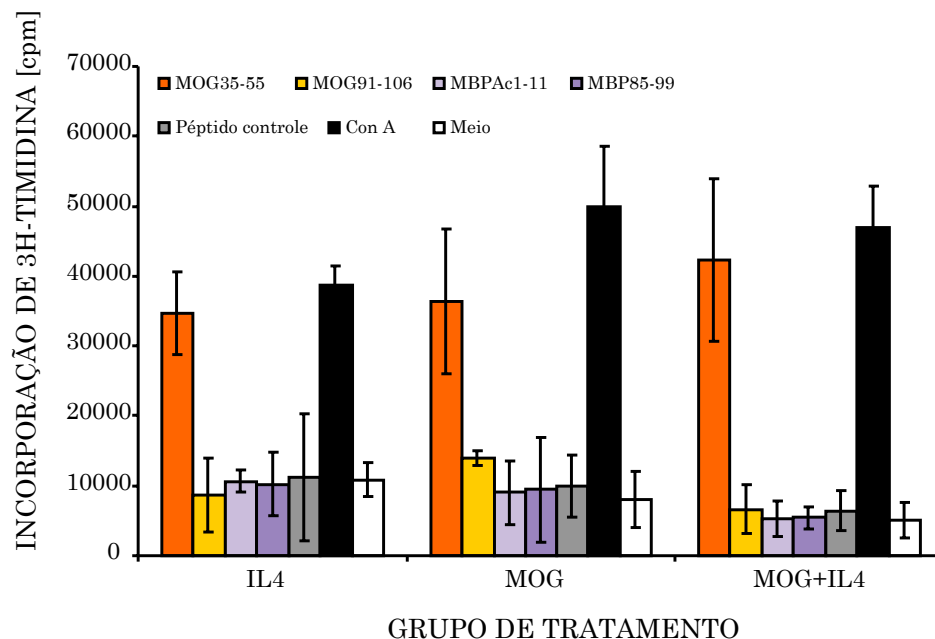


Figura 16. Ensaio de proliferação em ratinhos C57BL/6 induzidos com EAE e tratados por administração de vacinas de ADN codificadoras de MOG e IL-4. Ratinhos C57BL/6 foram induzidos com EAE por imunização com MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. duas doses com 48 horas de intervalo a partir da data de imunização). Após instalação de sinais clínicos de doença, os animais foram tratados com vacinas de ADN codificadoras de MOG e IL-4, isoladamente e em co-vacinação. No final da experiência, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas, e a capacidade proliferativa testada contra um painel de péptidos, incluindo o péptido cognato MOG35-55, outros epítopos de mielina (MOG91-106, MBPAc1-11, MBP85-99), péptido controle (HSVP16) e concanavalina A (Con A). Todos os péptidos a 10 µg/ml, Con A a 2 µg/ml. Os resultados mostrados são a média das contagens por minuto (cpm) ± desvio padrão, de amostras triplicadas.

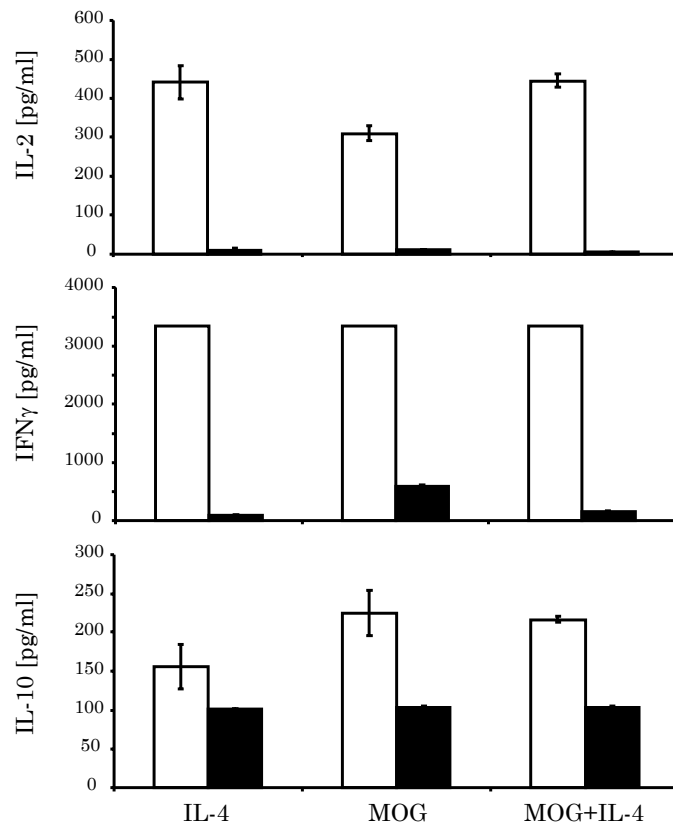


Figura 17. Produção de citocinas após vacinação terapêutica com ADN. Ensaio de produção de citocinas de linfócitos periféricos de ratinhos C57BL/6 induzidos com EAE e tratados por administração de vacinas de ADN codificadoras de MOG e IL-4. Ratinhos C57BL/6 foram induzidos com EAE por imunização com MOG35-55 (100 μ g/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. duas doses com 48 horas de intervalo a partir da data de imunização). Após instalação de sinais clínicos de doença, os animais foram tratados com vacinas de ADN codificadoras de MOG e IL-4, isoladamente e em co-vacinação. No final da experiência, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas, e a capacidade de produção de citocinas testada por reacção ELISA após estimulação com o péptido cognato MOG35-55 (barras brancas) ou péptido controlo HSVP16 (barras pretas) (ambos os péptidos a 10 μ g/ml). Os resultados mostrados são a média das concentrações de citocinas \pm desvio padrão, de amostras duplicadas.

7. Tratamento de formas crónicas de EAE com vacinação com ADN codificador de vários genes de mielina: vacinação multigénica ou de *cocktail*.

No seguimento das experiências anteriores, que demonstraram a eficácia da vacinação com ADN no tratamento de formas estabelecidas de EAE, decidimos utilizar a mesma estratégia nos modelos crónicos de doença, mas nos quais ocorressem surtos – i.e. semelhante ao que sucede nos doentes com Esclerose Múltipla. Neste caso, no entanto, optámos também por modificar a estratégia terapêutica, para levar em conta a possibilidade da diversificação de epítomos da resposta T. Tem sido postulado (revisto no Capítulo I, e em (17-22)) que o alargamento da resposta linfocitária a outros antígenos dentro da mesma molécula de mielina, ou noutras (diversificação intra e intermolecular, respectivamente), possa ser responsável pela progressão das doenças desmielinizantes, e nomeadamente, pelo aparecimento de surtos clínicos. Na tentativa de evitar esse fenómeno, resolvemos adoptar uma estratégia de vacinação em que, utilizando combinações de constructos codificadores dos principais alvos antigénicos conhecidos para a EAE nas diversas estirpes, evitássemos que a resposta imune pudesse divergir a partir do antígeno original (utilizado para induzir doença) para outros antígenos. De maneira, também, a que não pudesse ocorrer diversificação intramolecular, utilizámos – tal como anteriormente para a vacina MOG - o constructo para a sequência completa das proteínas em questão. Na prática, clonámos vacinas de ADN para os constructos codificadores das proteínas MOG, MBP (já utilizados anteriormente), PLP e MAG, utilizando o mesmo protocolo anteriormente descrito, tal como a vacina para a citocina IL-4; todas estas vacinas foram combinadas numa única administração – vacinação multigénica ou *cocktail*.

Numa experiência-piloto inicial, usámos uma mistura das 4 vacinas de mielina (MBP, MOG, MAG e PLP – denominado daqui em diante por vacinação com *cocktail*) para tratar o modelo de EAE crónica induzida em

ratinhos SJL/J. Após o aparecimento do primeiro surto de desmielinização, os animais experimentais foram randomizados num grupo de tratamento (*cocktail*) e dois grupos de controlo correspondendo a tratamento com vector vazio (pTargeT) ou somente com veículo de solução. No total, foram feitas 6 administrações semanais de ADN, começando no dia 17 pós-imunização e até ao dia 54, tendo os animais sido seguidos até ao dia 87 pós-indução de doença. Como se pode observar, não foi aparente qualquer diferença no que diz respeito à gravidade da doença ao longo destes 3 meses, entre o grupo de tratamento e qualquer dos grupos de controlo (Figura 18A). Analisando, no entanto, os cursos clínicos para determinar o número de surtos (definidos como o aumento de 1 ou mais pontos na escala EAE, mantidos por 2 ou mais dias, após um período de estabilidade de pontuação de 2 ou mais dias), constatámos que a vacinação com *cocktail* resultou numa redução marcada da taxa de surtos média (60% em relação ao controlo não-vacinado, 47% em relação à vacinação com vector vazio), com mais de metade dos animais experimentais a terem 1 ou menos surtos, após o início do tratamento até ao final da experiência (Figura 18B).

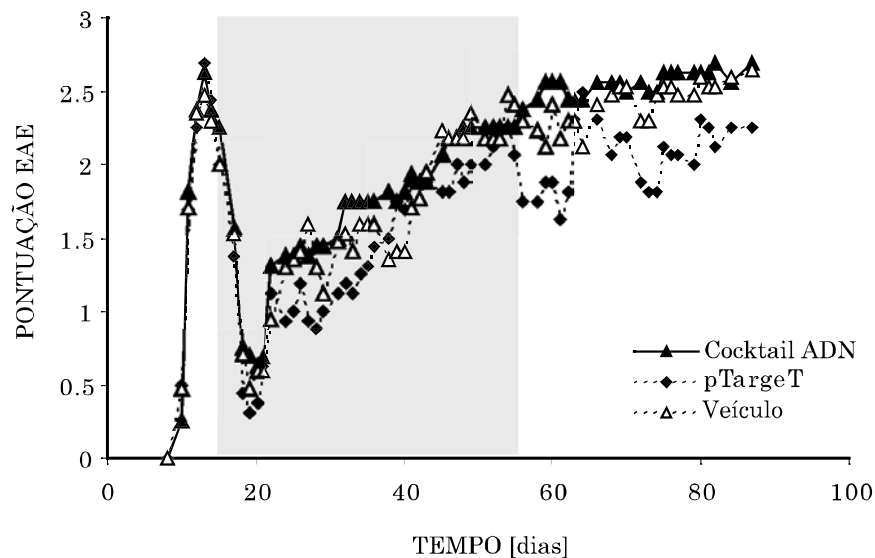
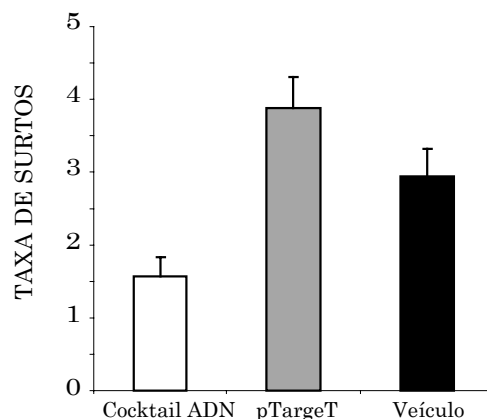


Figura 18A. Tratamento da EAE crónica em ratinhos SJL/J por vacinação multigénica/*cocktail* com ADN codificador de proteínas de mielina. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com o péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.), e randomizados no pico do primeiro surto clínico em três grupos: tratamento com combinação das vacinas MBP, MOG, MAG e PLP (vacinação *cocktail* ADN – 50 µg/constructo/animal/semana/i.m., n=16), tratamento com vector vazio (pTargeT – 100

µg/animal/semana/i.m., n=16), ou com veículo de solução (veículo em idêntico volume à vacinação com cocktail, n=17). O tratamento teve início no dia 17 pós-indução, e foi continuado até ao dia 54, após o qual os animais experimentais foram seguidos até ao dia 87. Os resultados mostrados são as médias das pontuações clínicas para cada grupo ao longo da duração da experiência; a cinzento encontra-se assinalada a duração do tratamento.



	Cocktail ADN	pTargetT	Veículo
n	16	16	17
Número/Taxa de surtos	25/1.563	62/3.875	50/2.941
Valor p		<0.0008	0.0013
% de redução vs		60%	47%
Animais com ≤1 surto	9	1	4
% animais com ≤1 surto	56%	6.25%	23.53%

Figura 18B. Tratamento da EAE crónica em ratinhos SJL/J por vacinação multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina. Análise da taxa de surtos em cada grupo de tratamento da experiência anterior. Mostrados os resultados para a taxa de surtos + desvio padrão de cada grupo de tratamento. Na tabela anexa, estão representados o número de animais por grupo (n), o número de surtos cumulativos e taxa de surtos por 3 meses (Número/Taxa de surtos, calculada como o número de surtos total dividida pelo número de animais), significância estatística entre a taxa de surtos do grupo de tratamento com cocktail ADN e os dois grupos de controlo (valor p, teste Mann-Whitney), percentagem de redução da taxa de surtos entre o tratamento com cocktail ADN e os grupos controlo (%), número (n) de animais com ≤ a 1 surto e sua percentagem em relação ao número de animais em cada grupo (%).

No seguimento desta experiência, tentámos potenciar a eficácia da vacinação multigénica, na redução da gravidade clínica da EAE, e, igualmente, na taxa de surtos, através da junção da vacina com o constructo IL-4, ao *cocktail* de vacinas de mielina. Esta combinação havia sido eficaz, como descrevemos nos pontos anteriores, quer na prevenção, quer no tratamento da EAE, no modelo de EAE em ratinhos C57BL/6 (prevenção e tratamento) e SJL/J (prevenção). Tal como anteriormente, utilizámos o

modelo de EAE crónica em ratinhos S/JL/J, e após o primeiro surto de desmielinização, randomizámos os animais experimentais em 3 grupos de tratamento, que receberam as vacinas PLP139-151 e IL-4, *cocktail*, ou *cocktail* e IL-4, tendo como grupos de controlo a vacinação com o vector vazio, ou somente com veículo de solução. Igualmente como na experiência anterior, os animais foram tratados semanalmente com injeções intramusculares de ADN, e foram seguidos durante quase 3 meses. Os resultados desta experiência, quer no que diz respeito à gravidade da doença, quer no que diz respeito à taxa de surtos, confirmaram o que tínhamos observado anteriormente; a vacinação com *cocktail* reduz a taxa de surtos, mas não parece surtir efeito na redução da gravidade da doença (Figura 19A e B). Em comparação com este tratamento, a vacinação com o minigene PLP139-151 e IL-4, ou com o *cocktail* e IL-4 revelou diferenças interessantes em relação à redução da taxa de surtos; o grupo tratado com o constructo PLP139-151 e IL-4 demonstrou uma redução da taxa de surtos menor que o grupo *cocktail*, que, por sua vez, teve uma redução menor que o grupo tratado com a combinação *cocktail* e IL-4 (Figura 19B). Comparando todos os grupos, o tratamento com *cocktail* e IL-4 mostrou diferenças estatisticamente significativas em relação a todos os grupos de tratamento, exceptuando com o *cocktail* isolado; por outro lado, apenas os grupos tratados com *cocktail* demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo de controlo tratado com veículo no que diz respeito à taxa de surtos, e apenas o grupo tratado com *cocktail* e IL-4 no que diz respeito ao número de animais sem surtos (41% no grupo tratado com *cocktail* e IL-4 vs. 5% no grupo de controlo) (Figura 19B).

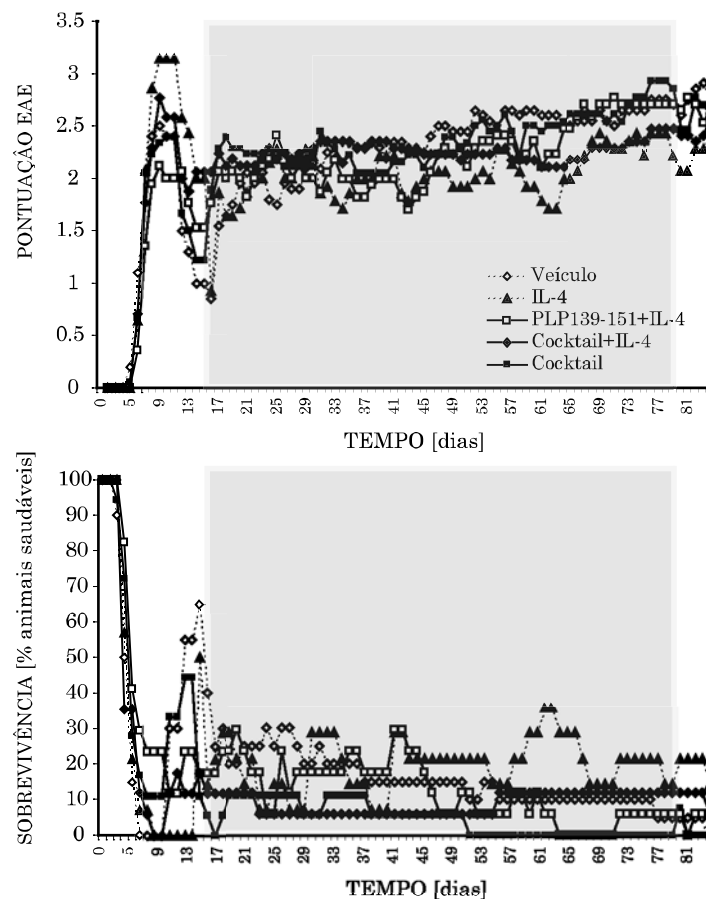
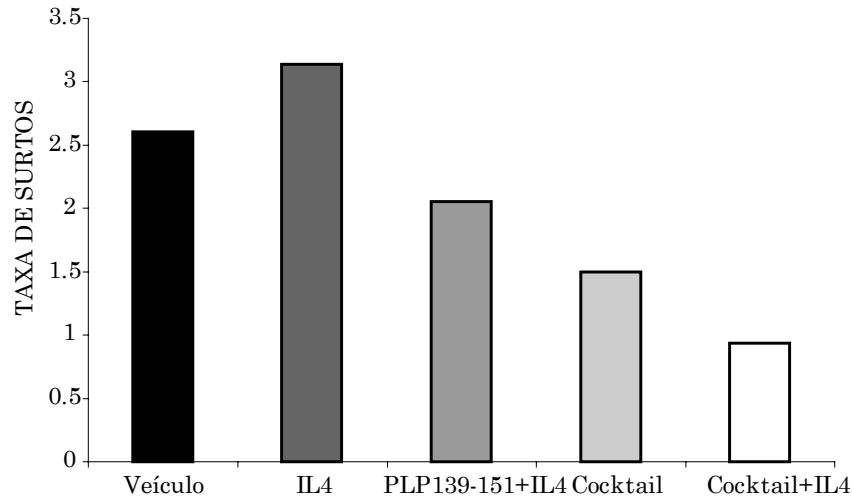


Figura 19A. Tratamento da EAE crónica em ratinhos SJL/J por vacinação multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com o péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.), e randomizados após recuperação do primeiro surto clínico em cinco grupos: tratamento com o minigene PLP139-151 e IL-4 (PLP139-151+IL-4+pTarget, 100 µg de cada constructo/animal/semana/i.m., n=17) tratamento com combinação das vacinas MBP, MOG, MAG e PLP (cocktail+pTarget– 50 µg de cada constructo de mielina+100 µg de pTarget/animal/semana/i.m., n=18), tratamento com combinação cocktail e IL-4 (cocktail+IL-4, 50 µg de cada constructo de mielina+100 µg de IL-4/animal/semana/i.m., n=17, tratamento com IL-4 (IL-4, 100 µg do constructo IL-4+200 µg de pTarget/animal/semana, n=14), ou com veículo de solução (veículo em idêntico volume à vacinação com cocktail, n=20). O tratamento teve início no dia 16 pós-indução, e foi continuado até ao dia 79, após o qual os animais experimentais foram seguidos até ao dia 89. Os resultados mostrados são as médias das pontuações clínicas para cada grupo ao longo da duração da experiência (cima) e a percentagem de animais saudáveis em cada grupo (baixo); a cinzento encontra-se assinalada a duração do tratamento.



Vacina de ADN	n	Surtos	Taxa surtos	Comparação c/ Ck+IL-4	Comparação c/ veículo	Animais s/ surtos	Comparação c/ veículo
Veículo	20	52	2.6	p<0.0005	-	1 (5%)	-
IL-4	14	44	3.1	p<0.0003	p<0.419	0	p=1.00
PLP139-151 + IL-4	17	35	2.1	p<0.0064	p<0.284	2 (12%)	p<0.584
Cocktail	18	27	1.5	p<0.1498	p<0.026	4 (22%)	p<0.170
Cocktail + IL-4	18	16	0.9	-	p<0.001	7 (41%)	p<0.014

Figura 19B. Tratamento da EAE crônica em ratinhos SJL/J por vacinação multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina. Análise da taxa de surtos em cada grupo de tratamento da experiência anterior. Mostrados em gráfico os valores da taxa de surtos média para o período de 3 meses da experiência para cada grupo de tratamento (cocktail=vacinação multigénica com constructos MBP, MOG, MAG e PLP). Na tabela anexa estão mostrados os dados para número de animais por grupo (n), número de surtos cumulativo no final da experiência (surtos), taxa de surtos aos 3 meses (taxa surtos), comparação entre a taxa de surtos no grupo Cocktail+IL-4 (Ck+IL-4) e os outros grupos de tratamento (valor p, teste Mann-Whitney), comparação da taxa de surtos entre o grupo tratado com veículo e os outros grupos de tratamento (valor p, teste Mann-Whitney), número de animais sem surtos por cada grupo de tratamento, e comparação deste número com o grupo de controlo (valor p, teste exacto de Fisher).

De forma a analisar o fenótipo celular dos linfócitos T, nos diversos grupos de tratamento desta experiência, estabelecemos culturas celulares, enriquecidas para linfócitos T por selecção negativa, utilizando colunas de purificação que eliminam os linfócitos B e células apresentadoras de antígeno. Estas culturas linfocitárias T foram mantidas *in vitro* durante duas semanas, após uma estimulação inicial com o péptido utilizado para a imunização (PLP139-151), e foram depois testadas para a sua capacidade

proliferativa e de produção de citocinas. No que diz respeito à capacidade proliferativa, observámos a existência de diferenças entre os diversos grupos de tratamento após estimulação com o péptido cognato; curiosamente, o grupo de tratamento com a vacina IL-4, que revelou a maior taxa de surtos, também demonstrou a maior capacidade proliferativa (Figura 20). Nos outros grupos de tratamento com vacinas de mielina, houve uma supressão parcial da proliferação em comparação com este grupo, sobretudo tratamento com o constructo do minigene PLP139-151 e IL-4. Nos grupos tratados com *cocktail* de vacinas, com e sem adição da vacina IL-4, esta supressão foi menos acentuada (embora muito menor que para o grupo IL-4), sendo, mesmo, para o grupo *cocktail*+IL-4, idêntica ao controlo não vacinado. Este efeito parcial na capacidade proliferativa, observado após vacinação com ADN, está de acordo com o mecanismo de acção proposto para as vacinas de ADN no tratamento da EAE, em que não se observam efeitos dramáticos sobre a capacidade proliferativa. É, no entanto, interessante, verificar que, nos grupos tratados com vacinas de mielina (exceptuando, portanto, o grupo de controlo IL-4), a manutenção da capacidade proliferativa dos linfócitos T parece estar associada à sua eficácia. Igualmente, uma vez mais, a utilização isolada da vacina com o constructo IL-4 não demonstrou eficácia, e resultou, mesmo, num aumento da taxa de surtos, e da capacidade proliferativa. Em relação ao fenótipo Th, baseado na produção de citocinas, após estimulação destas linhas celulares com péptido, os resultados obtidos foram em certa medida inesperados. A medição da secreção de IL-4, IL-10 e IFN γ nos três grupos vacinados com ADN confirmou a ocorrência de uma modificação Th2 para os grupos tratados com o *cocktail* de vacinas, e com o *cocktail* e IL-4, em comparação com o grupo tratado somente com a vacina IL-4 (Figura 21); nestes dois grupos tratados com o *cocktail* de vacinas de mielina, detectou-se uma grande capacidade de produção de IL-4 e IL-10, enquanto que no grupo tratado com a vacina IL-4, as linhas celulares produziram sobretudo IFN γ (Figura 21). Este efeito foi ainda mais pronunciado para o grupo *cocktail*+IL-4, do que para o grupo *cocktail*, de acordo com as diferenças de eficácia clínica observadas, e

também de acordo com o observado anteriormente no modelo de EAE em ratinhos C57BL/6.

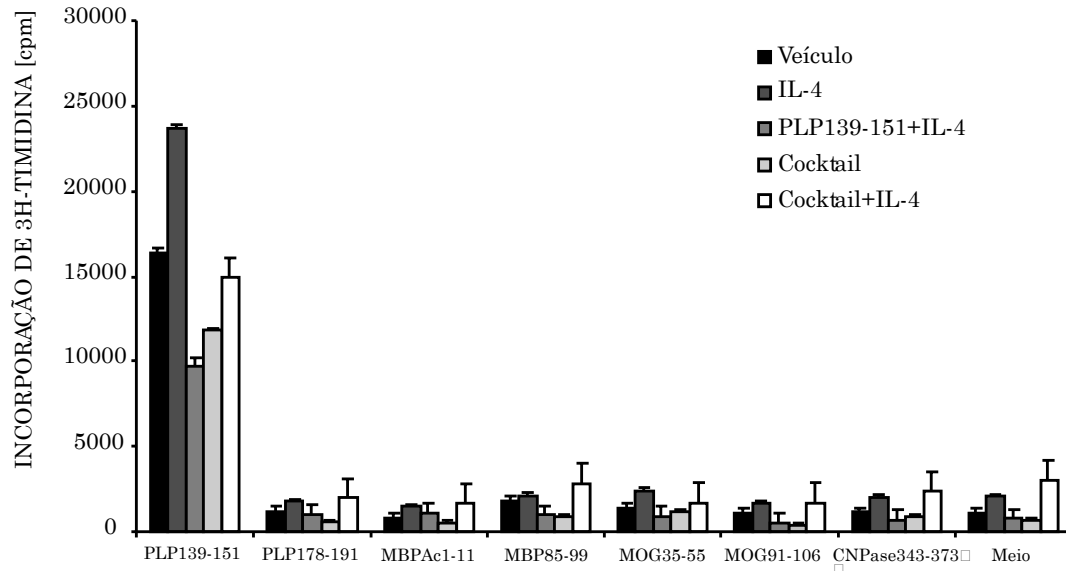


Figura 20. Ensaio de proliferação a partir de linhas celulares T derivadas de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados com vacinas de ADN codificadoras de constructos de mielina. No final da experiência anterior, os gânglios linfáticos de drenagem do conjunto de animais de cada grupo foram dissecados, culturas celulares estabelecidas e enriquecidas para a linfócitos, na presença do péptido cognato (PLP139-151, 10 µg/ml). Após 1 ciclo de proliferação, as linhas celulares T assim derivadas foram testadas contra um painel de péptidos de mielina, incluindo o péptido cognato PLP139-151, e vários outros péptidos de mielina (0.1x10⁵ linfócitos, 0.5x10⁶ APC singénicas irradiadas, todos os péptidos a 20 µg/ml). Os resultados mostrados são a média das contagens por minuto (cpm) + desvio padrão de amostras duplicadas. Valores de proliferação na presença de concanavalina A (Con A, 2 µg/ml) não mostrados (veículo 28646,2 ± 2870; IL-4 85743,4 ± 1541,1; PLP139-151+IL-4 27465,3 ± 1625; cocktail 36299,3 ± 495,2; cocktail+IL-4 21491,6 ± 1424,5).

Inesperado, no entanto, foi o resultado da comparação com o grupo tratado apenas com veículo; as linhas celulares destes animais revelaram a maior capacidade de produção de IL-4 e IL-10, e a menor de IFN γ ; ou seja, a vacinação com ADN, apesar de ser eficaz, resultou, na prática, num enviesamento Th1 da resposta linfocitária T em relação com o grupo não vacinado (Figura 21 e 22). Uma vez que este efeito não pode ser observado em nenhuma das experiências anteriores, incluindo a experiência de tratamento no modelo de EAE em C57BL/6, a nossa interpretação foi de que a administração prolongada de vacinas de ADN, embora possa ter efeitos

benéficos no que diz respeito a medidas clínicas de eficácia, tem como efeito secundário, o enviesamento da resposta antígeno-específica. Ou seja, em experiências de longo termo, como foi o caso, em que animais experimentais foram seguidos durante 3 meses e vacinados semanalmente com 300 µg de ADN, há um efeito cumulativo da administração prolongada de ADN na determinação fenotípica das células T. Este efeito poderia ser causado pelos efeitos biológicos, não antígeno-específicos, da administração de ADN bacteriano, por oposição à imunomodulação antígeno-específica em relação ao antígeno codificado na vacina de ADN. É um facto bem conhecido que o ADN bacteriano tem propriedades imunogénicas próprias, mediadas pela presença de sequências de ADN específicas, denominadas sequências CpG

(citosina-fosfato-guanina) não metiladas, que activam o sistema imune inato através de interacções com o receptor TLR9 (23-25). Como tal, os efeitos benéficos, antígeno-específicos, da vacinação com ADN, sobretudo em modelos prolongados, poderiam ser contrabalançados por efeitos deletérios não-antígeno específicos do vector de vacinação.

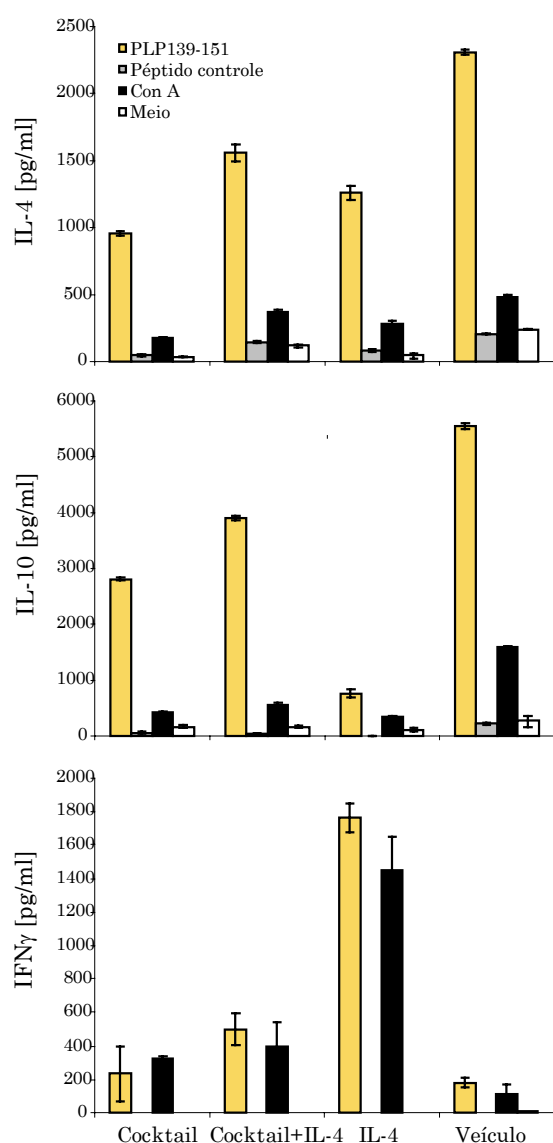


Figura 21. Ensaio de produção de citocinas a partir de linhas celulares T derivadas de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados com vacinas de ADN codificadoras de constructos de mielina. No final da experiência anterior, os gânglios linfáticos de drenagem do conjunto de animais de cada grupo foram dissecados, culturas celulares estabelecidas e enriquecidas para linfócitos, na presença do péptido cognato (PLP139-151, 10 µg/ml). Após 1 ciclo de proliferação, a capacidade de produção de citocinas das linhas celulares T assim derivadas foi testada após estimulação com o péptido cognato (PLP139-151 10 µg/ml), péptido controlo (HSVP16 10 µg/ml) e concanavalina A

(Con A 2 µg/ml)(0.1×10^6 linfócitos, 5×10^6 APC singénicas irradiadas, num volume final de 2 ml de meio RPMI enriquecido). Os resultados mostrados são a média das concentrações de citocinas \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

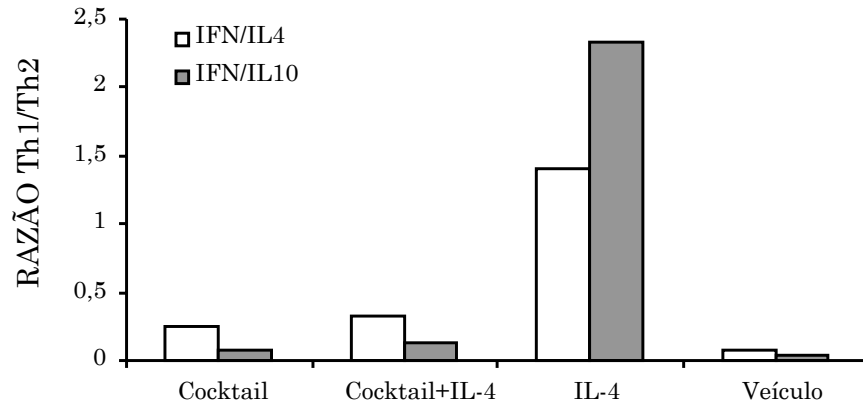


Figura 22. Ensaio de produção de citocinas a partir de linhas celulares T derivadas de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados com vacinas de ADN codificadoras de constructos de mielina. Mostradas as razões médias Th1/Th2 para os quatro grupos da Figura 21, obtidas pela razão entre a quantidade de IFN γ e IL-4 ou IL-10.

Para estudar a resposta linfocitária B após vacinação com ADN, utilizámos uma nova tecnologia, desenvolvida no nosso laboratório, para detectar a presença de anticorpos de forma simultânea contra numerosos alvos antigénicos (para uma descrição pormenorizada, ver (26-28)). De forma resumida, esta tecnologia é baseada na aplicação do processo de fabrico de *gene spotted arrays*, desenvolvido por Pat BROWN na Universidade de Stanford (<http://brownlab.stanford.edu/>), em que um *robot* é utilizado para imprimir pontos microscópicos, contendo um ADNc, em localizações determinadas, previamente, de forma ordenada, e controlada por computador, em lâminas de microscopia, previamente preparadas para esse efeito (Figura 23). Nesta aplicação, desenvolvida por William ROBINSON no nosso laboratório, o mesmo processo é utilizado para imprimir pontos contendo soluções de péptidos ou proteínas, de forma a criar um *array* (assim denominado o conjunto de pontos-alvo ordenado numa base material, neste caso a lâmina de microscopia), contendo um conjunto de alvos antigénicos de importância reconhecida, ou presumível, em várias doenças autoimunes, incluindo a EAE e a Esclerose Múltipla. A presença de anticorpos contra qualquer destes alvos antigénicos é detectada após

incubação do líquido biológico em questão (soro, líquido cefalorraquidiano) com um *array*, seguida de lavagem e incubação com um anticorpo secundário anti-IgG/IgM fluorescente, sendo a revelação feita por excitação com luz *laser* em aparelhos de *scanning* especialmente desenvolvidos (Figura 23).

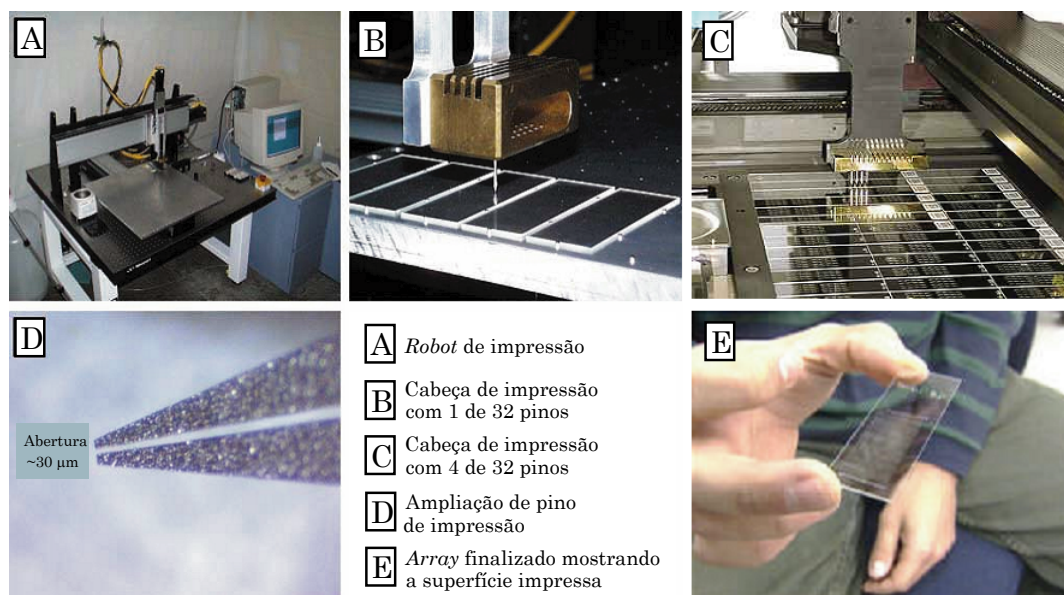


Figura 23. Processo de fabrico de *spotted microarrays*. Empregando a mesma tecnologia utilizada para construir *arrays* de ADNc, um robot de impressão controlado por computador (A) é empregue para imprimir pontos contendo soluções de proteínas ou péptidos de interesse em lâminas de microscopia previamente cobertas de poli-L lisina (B, C, D), de forma ordenada e pré-determinada de acordo com um mapa elaborado, para que cada proteína ou péptido seja impresso numa zona determinada do *array*. No final (E), obtém-se um *array* consistindo de uma lâmina de vidro impressa com 2304 pontos contendo alvos antigénicos de interesse, controlos positivos e negativos, e marcadores de posição (imagens obtidas a partir do site do laboratório BROWN e por nós modificadas).

Cada *array* individual consiste numa lâmina coberta com 2304 pontos ordenados, agrupados 4 a 4 para um total de 576 grupos, sendo cada grupo a representação de um único alvo antigénico em quadruplicado. Normalmente, adicionam-se pontos positivos, que servem de marcadores posicionais destinados a ajudar ao processamento dos *arrays*. Cada alvo antigénico (grupo) é, normalmente, representado mais do que uma vez em cada *array*, em localizações diversas, de forma a evitar falsos negativos por erro de impressão na lâmina; são, igualmente, incluídos controlos negativos e

positivos, em localizações diversas, uma vez mais para controlo interno de qualidade do *array* (Figura 24). Dado o seu processo de fabrico, é possível adicionar e/ou retirar alvos antigénicos antes da impressão das lâminas, caso se deseje estudar a resposta de anticorpos contra um antígeno particular que normalmente não seja incluído.

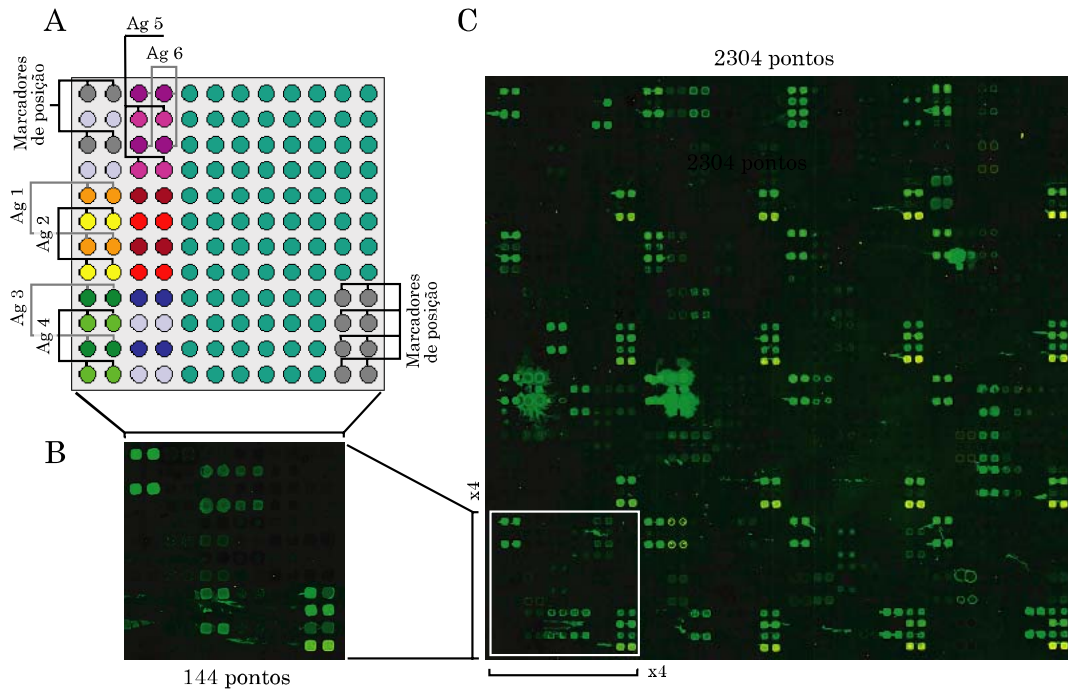


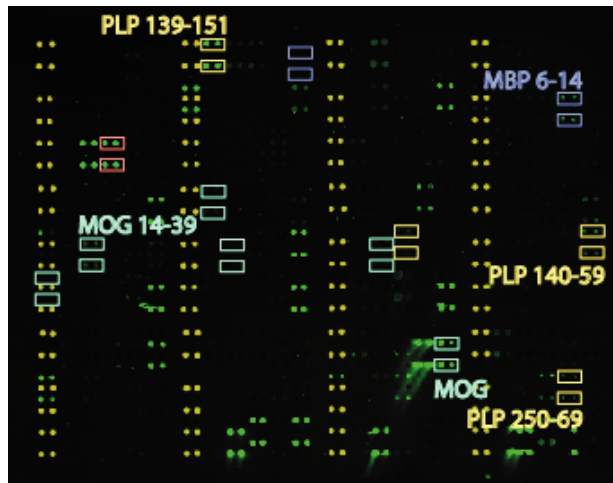
Figura 24. Esquema de um *array* de antígenos de mielina completo. Cada *array* individual (C) é subdividido em 16 quadrantes de 144 pontos (A e B). A - Em cada quadrante, estão impressos marcadores de posição que estão sempre visíveis para fins de orientação (A); cada antígeno é representado por um conjunto de 4 pontos impressos, agrupados 2 a 2, pelo que cada quadrante, em teoria, pode conter 32 antígenos diferentes (representados exemplos a cores para 6 antígenos diferentes no esquema A – Ag1, Ag2, Ag3, Ag4, Ag5, Ag6). B – Imagem de *scanning* de um quadrante individual, contendo os marcadores de posição e apresentando reactividade visível contra 4 antígenos diferentes. C – Imagem de *scanning* de um *array* individual contendo a totalidade de 2304 pontos impressos em 16 quadrantes. Para além dos marcadores de posição para cada quadrante, é observável reactividade contra diversos alvos antigénicos,

Neste caso, utilizámos *arrays* contendo cerca de 232 antígenos distintos, incluindo proteínas e conjuntos de péptidos de sequência sobreposta, representando alvos antigénicos de importância reconhecida na EAE e EM, tais como as proteínas MBP, Golli-MBP (produto alternativo do gene MBP contendo uma sequência peptídica Golli associada à proteína MBP (29)), PLP, MOG, MOBP (proteína básica oligodendrocítica associada à

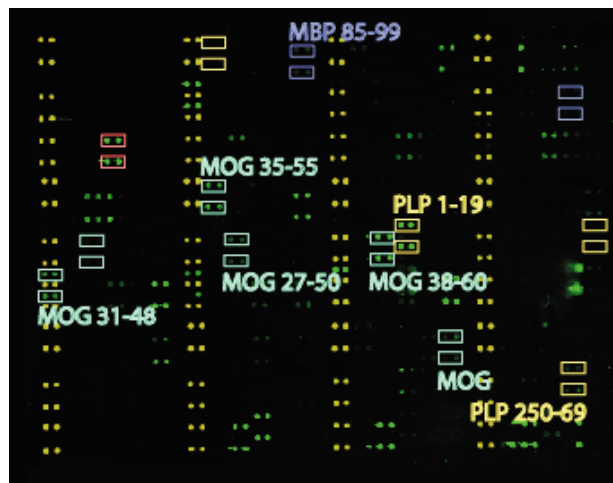
mielina), OSP (proteína específica oligodendrocítica), α B-Cristalina e CNPase (fosfodiesterase nucleotídica cíclica). Num conjunto inicial de experiências, destinadas a validar a utilização destes *arrays* no modelo de EAE (28), os *arrays* foram incubados com soro de ratinhos SJL/J induzidos com EAE utilizando emulsões de péptidos reconhecidamente encefalitogénicos, tal como os péptidos PLP139-151 e MBP85-99. Analisando a reactividade de *arrays* individuais incubados com o soro de um único animal (Figura 25), pode-se observar que num animal não imunizado não existe reactividade contra nenhum dos antigénios de mielina presentes no *array*. Por outro lado, após imunização com os péptidos encefalitogénicos mencionados, em animais que tinham sinais clínicos de EAE consegue-se detectar a presença de anticorpos, não só contra o péptido imunizador, mas, também, contra outros péptidos presentes no *array*, e pertencentes a outras proteínas de mielina, tais como a MBP, MOG e PLP. Para cada um destes antigénios, a especificidade da resposta linfocitária B observada foi diferente: nos animais imunizados com PLP139-151, para além de anticorpos contra o péptido PLP139-151, foram detectados anticorpos contra os péptidos PLP140-159, PLP250-269, MBP6-14 e MOG14-39; nos animais imunizados com MBP85-99, para além de anticorpos contra este péptido, foram também detectados anticorpos contra PLP250-269, MOG27-50, MOG31-48, MOG35-55 e MOG38-60. Estes resultados significam que, no que diz respeito à resposta linfocitária B – produção de anticorpos –, conseguimos detectar a ocorrência do fenómeno de diversificação de epítomos, em que a resposta imune alastra a partir de um antigénio original para vários outros antigénios secundários, quer dentro da mesma molécula (diversificação intramolecular) quer para outras moléculas (diversificação intermolecular). Este achado experimental é a primeira observação confirmada de diversificação de epítomos da resposta B no modelo de EAE, e tem consequências fisiopatológicas potencialmente importantes nesta doença.



A. Soro normal



B. Imunização com PLP139-151



C. Imunização com MBP85-99

Análise quantitativa

Antígeno	Array A	Array B	Array C
PLP1-19	322	1214	12328
PLP139-151	321	15704	319
PLP140-159	90	3971	-31
PLP250-259	400	2112	1469
MBP6-14	303	4692	604
MBP85-99	-5	-115	1816
MOG14-39	246	2548	764
MOG27-50	10	4	2394
MOG31-48	48	81	3670
MOG35-55	493	952	4227
MOG38-60	271	796	7202
Proteína MOG	-62	22980	1501
α-IgG	25000	25000	25000

Figura 25. Detecção de anticorpos anti-mielina no soro, e diversificação de epítomos da resposta linfocitária B, através de myelin spotted arrays após indução de EAE em ratinhos SJL/J. A presença de anticorpos anti-mielina foi testada com arrays ordenados contendo várias proteínas e sequências peptídicas parciais. As imagens representam arrays individuais testados com o soro de um único animal experimental. Os pontos amarelos são marcadores de referência posicional, e os pontos verdes representam a presença de anticorpos específicos detectados por fluorescência laser após marcação com anticorpo secundário anti-IgG/M conjugado com Cy3. A – soro normal de ratinho SJL/J, que não mostra qualquer reactividade. B – soro de ratinho SJL/J 10 semanas após imunização com PLP139-151 em ACF; detectam-se anticorpos contra o antígeno indutor (PLP139-151), bem como contra outros antígenos na mesma proteína e noutras (reactividades assinaladas na Figura). C - soro de ratinho SJL/J 10 semanas após imunização com MBP85-99 em ACF; detectam-se anticorpos contra o antígeno indutor (MBP85-99), bem como contra a PLP e MOG (reactividades assinaladas na Figura). Na tabela junta encontra-se uma análise quantitativa dos três arrays mostrados, após normalização para a reactividade anti-IgG total; as reactividades positivas em cada encontram-se marcadas a cor.

De facto, na tentativa de estudar o perfil de diversificação da resposta auto-reactiva na EAE aguda, induzimos ratinhos SJL/J com EAE utilizando protocolos de imunização com os péptidos PLP139-151, MBP85-99 e homogeneizado de medula espinhal (HME). Cerca de 7 dias após o pico da doença, e durante um período de recuperação parcial, obtivemos soro destes animais e estudámos a resposta linfocitária B utilizando os *arrays* de mielina. De maneira a seleccionar, dentro dos mais de 200 antigénios presentes, apenas aqueles com reactividades possuindo diferenças estatisticamente significativas entre grupos de animais imunizados, utilizámos programas de análise de agrupamento com uma função de emparelhamento por similitude, e um algoritmo de significância estatística (*Significance Analysis of Microarrays*). Desta forma, conseguimos distinguir padrões não facilmente perceptíveis numa análise inicial, em que cada antigénio específico utilizado para a imunização induziu um padrão diferente de diversificação de reactividade. Ratinhos SJL/J, induzidos com o péptido PLP139-151, evidenciaram uma forte reactividade contra o antigénio imunizador, e também contra um grupo limitado de antigénios contidos nas proteínas MBP, MOG e PLP (Figura 26A). Por outro lado, a imunização com MBP85-99 induz anticorpos contra esta proteína, e também baixas reactividades contra outros antigénios derivados da MBP e PLP. Finalmente, a imunização com HME induz anticorpos, de baixa reactividade, contra um conjunto alargado de antigénios derivados da PLP, MBP e MOG. Comparando os diferentes grupos de animais, é possível encontrar antigénios contra os quais a resposta é partilhada por todos os grupos ou apenas por dois deles, e antigénios cuja resposta parece ser específica para apenas um dos grupos imunizados. Foi possível, dentro de cada grupo, identificar sub-agrupamentos com base no padrão de auto-reactividade através do programa de análise de agrupamento, que os colocou no mesmo subnodo do dendrograma (Figura 26A). No seguimento desta experiência, os ratinhos imunizados com PLP139-151 e MBP85-99 foram seguidos clinicamente durante 10 semanas, e a taxa de surtos calculada para cada grupo; quando estas taxas foram calculadas para os sub-

agrupamentos mencionados, tornou-se evidente que existiam marcadas diferenças entre eles, e que, quanto maior a extensão da diversificação de epítomos, maior também a taxa de surtos (Figura 26A). Quando comparámos o padrão de diversificação entre sub-agrupamentos, dentro de cada grupo de imunização, foi possível observar a existência de diferenças entre padrões, com aumento de reactividade relativo contra diversos antigénios de mielina nos animais que desenvolveram doença clinicamente mais severa e com maior taxa de surtos (Figura 26B e C). Ou seja, no seu conjunto, estes resultados demonstraram que era possível prever, com base no padrão de reactividade linfocitária B no surto inicial de doença, o curso clínico subsequente, e que quanto maior a diversificação de anticorpos, pior o prognóstico clínico.

De seguida, procurámos analisar a evolução desta resposta de diversificação em modelos de EAE crónica, comparando o padrão de reactividade original descrito acima, e o mesmo padrão ao fim de 10 semanas de EAE crónica, evoluindo por surtos e remissões. Dos mesmos animais experimentais empregues na experiência anterior, extraímos soro ao fim de 10 semanas de evolução e analisámos o padrão de reactividade. Como se pode observar (Figura 27), a análise de agrupamento e de significância estatística confirmou que o desenvolvimento de EAE crónica estava associado com uma marcada diversificação da resposta de anticorpos, a partir do antigénio indutor, contra vários outros antigénios de mielina, incluindo grupos de epítomos distintos nas proteínas MBP, PLP, MOG e CNPase. Uma vez mais, cada antigénio indutor pareceu comportar-se de forma distinta; por exemplo, dentro da proteína MBP, no grupo imunizado com PLP139-151 a resposta alastra predominantemente para o epítomo MBP71-89, enquanto que, no grupo imunizado com MBP85-99, a resposta secundária mais evidente é contra o epítomo MBP141-159. Observa-se uma grande heterogeneidade no padrão de reactividade entre grupos de imunização, e alguma dentro de cada grupo, o que reflecte a variabilidade

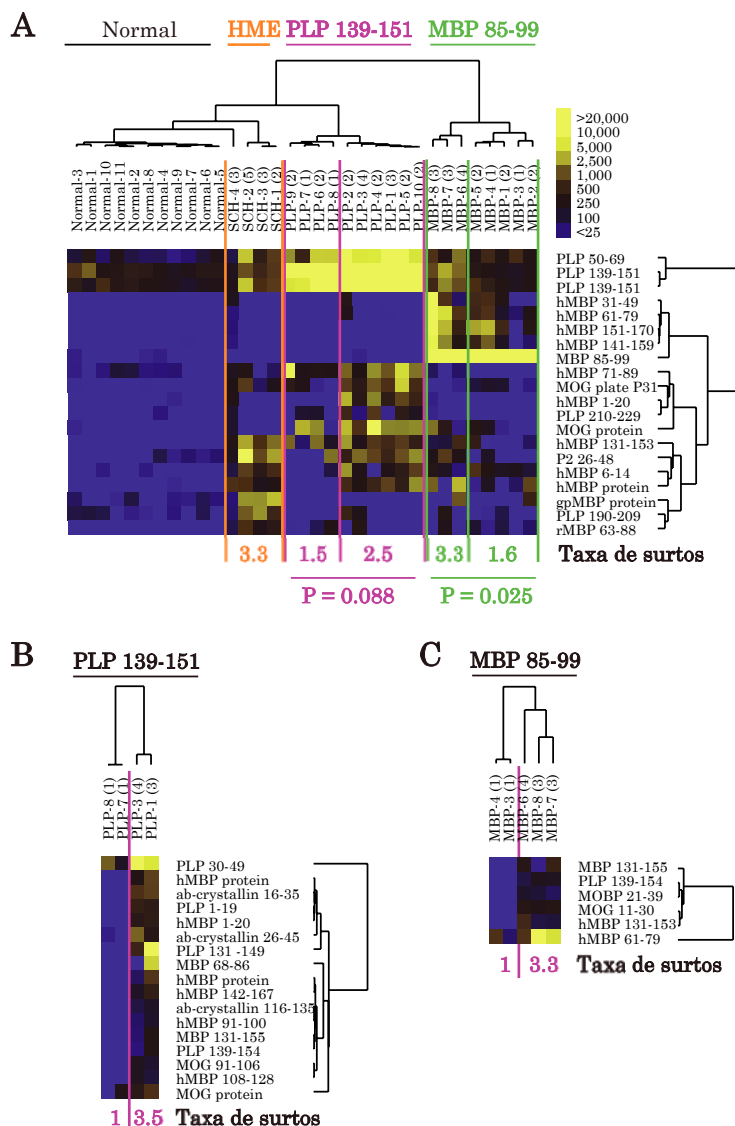


Figura 26. Previsão da gravidade da doença com base na diversidade da resposta de autoanticorpos no primeiro surto de EAE. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE através de imunização com os péptidos PLP139-151, MBP85-99 ou homogeneizado de medula espinhal (HME). Após a recuperação do primeiro surto clínico da doença (grupo PLP139-151 dia 17, grupo MBP85-99 dia 22, grupo HME dia 25), soro foi extraído de animais individuais e a presença de autoanticorpos detectada por *arrays* de mielina, em comparação com um grupo de animais normais. Os animais foram seguidos durante mais 10 semanas, e o número de surtos contados (indicado entre parentesis para cada animal).

A – mapa de reactividade agrupado hierarquicamente, mostrando os antígenos com diferenças estatisticamente significativas de reactividade entre o grupo

normal e os grupos induzidos com EAE. As taxas de surtos dos grupos de animais em cada subnodo principal estão mostradas no fundo do mapa, bem como os resultados dos valores p do teste Mann-Whitney para a comparação entre taxas de surto dentro do mesmo grupo.

Cada coluna corresponde a um animal e cada fila um antígeno; valores de reactividade representados de acordo com a escala de cor anexa. B e C – Antígenos com diferenças estatisticamente significativas de reactividade entre subgrupos de ratinhos com o maior (3 e 4) e menor (1) número de surtos dentro dos grupos induzidos com PLP139-151 e MBP85-99. Mapas de reactividade ordenados hierarquicamente por similitude de antígenos e animais; a taxa de surtos por cada subgrupo está mostrada no fundo do mapa.

individual, fisiológica, da resposta imune de cada animal. Existem, no entanto, antígenos contra os quais a resposta linfocitária B é comum a todos os grupos, tais como os epítotos PLP50-69, MBP131-153 ou MOG63-87. Apesar da magnitude do alastramento, a resposta contra o antígeno

original continuou a ser a mais significativa, o que é compreensível uma vez que, dado o protocolo de imunização utilizado, a emulsão contendo o antigénio indutor permanece nos animais experimentais durante longos períodos de tempo. O conjunto destas observações fornece dados importantes sobre a fisiopatologia da EAE, nomeadamente no que diz respeito à importância da resposta humoral anti-mielina, e à sua correlação com a evolução da doença. Os nossos resultados permitem estabelecer uma relação causal hipotética entre a presença de anticorpos anti-mielina, e, sobretudo, entre a magnitude da diversificação de epítomos da resposta humoral, e a taxa de surtos na EAE.

Uma vez que tínhamos demonstrado uma redução substancial da taxa de surtos em modelos de EAE crónica com o tratamento com vacinas de ADN, decidimos empregar a tecnologia de *arrays* de mielina para estudar a resposta humoral autoimune nestas experiências, de forma a determinar se as vacinas de ADN alteravam o perfil de resposta de anticorpos. Para tal, testámos o soro de vários grupos após 10 semanas de tratamento, utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente. Os resultados desta experiência demonstraram que nos dois grupos que tinham evidenciado uma maior redução da taxa de surtos (vacinação com *cocktail*, e *cocktail* com IL-4), existia uma supressão da diversificação de epítomos B em comparação com os grupos de controlo (Figura 28A). Os grupos de tratamento formaram agrupamentos discretos após análise, com uma separação evidente entre os animais vacinados com *cocktail* com e sem a vacina IL-4, correspondendo, igualmente, as diferentes taxas de surtos nestes grupos com graus diferentes de redução de epítomos. O grupo vacinado com *cocktail* e IL-4 demonstrou a menor taxa de surtos e a menor diversificação, seguido do grupo vacinado com *cocktail*. Em comparação com estes, o grupo controlo, incluindo animais não-vacinados, ou vacinados com vector vazio (pTarget), revelou uma marcada diversificação de epítomos, por exemplo com elevada reactividade contra os antigénios MBP1-20 e 13-21, e MOG1-26, que nos

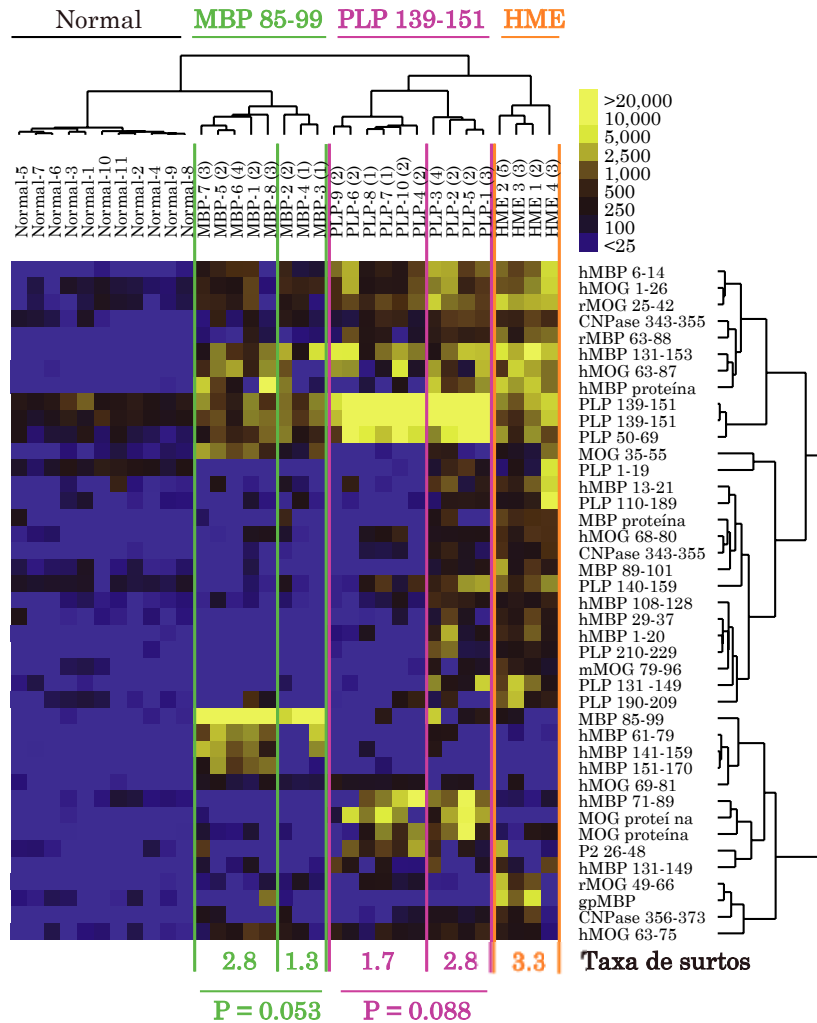


Figura 27. Diversificação intra e intermolecular da resposta linfocitária B na EAE crônica em ratinhos SJL/J. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE através de imunização com PLP139-151, MBP85-99 ou homogeneizado de medula espinhal (HME). Ao fim de 10 semanas de evolução, o soro de animais individuais foi testado para a presença de anticorpos anti-mielina utilizando *arrays* de mielina. Os resultados foram analisados para significância estatística (valor $q < 0.05$), e análise de agrupamento para agrupar antígenos e animais experimentais por similitude. Mostrados os resultados do mapa de reatividade (conforme escala de cor anexa), em que cada coluna representa um animal experimental, e cada fila um antígeno. Os dendrogramas representam as relações de similitude entre grupos de antígenos e entre grupos de animais. Para cada animal individual a taxa de surtos está indicada entre parêntesis, e para cada subnodo de agrupamento na porção inferior da Figura, com os valores de comparação estatística entre subnodos (valor p, teste de Mann-Whitney).

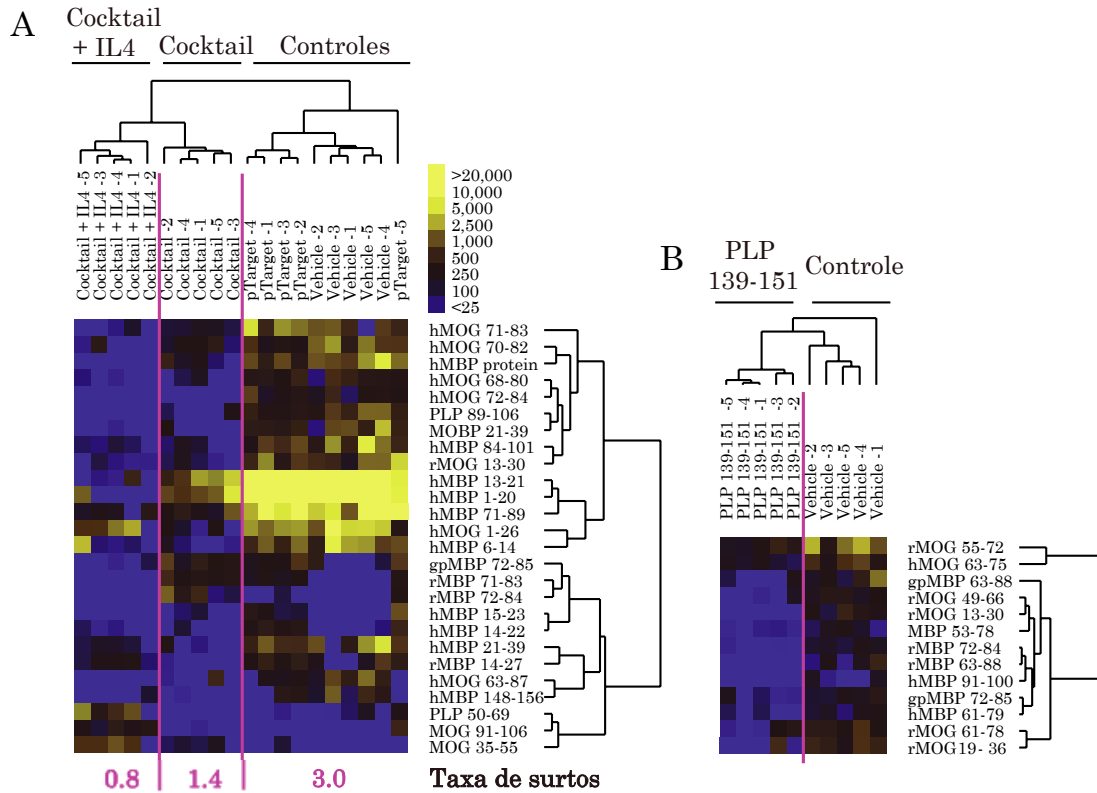


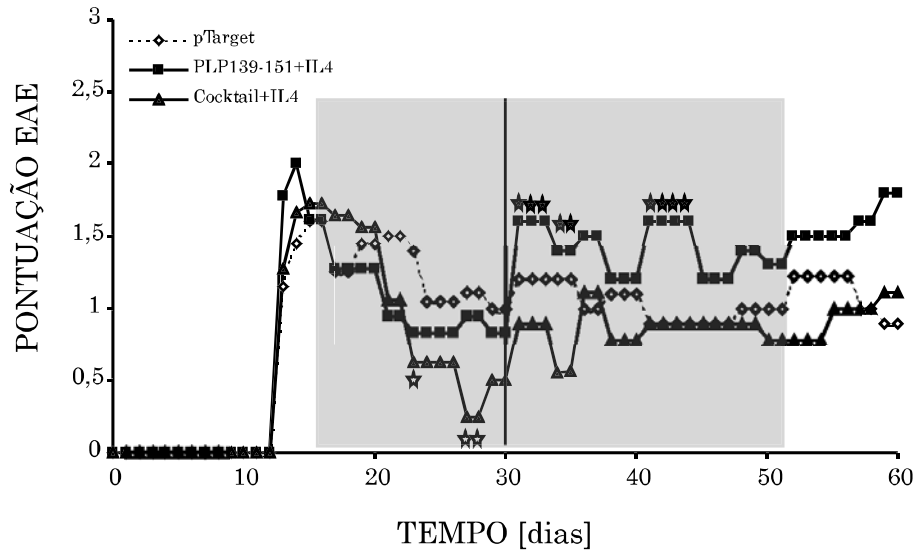
Figura 28. Redução da diversificação de epítomos da resposta linfocitária B pelo tratamento com vacinas de ADN codificadoras de antígenos de mielina. Na experiência reportada na Figura 19 (A), retirámos soro de ratinhos SJL/J induzidos com EAE crónica com surtos ao fim de 10 semanas de tratamento com a combinação das vacinas MBP, MOG, MAG e PLP com e sem adição da vacina IL-4 (Cocktail e Cocktail+IL-4, respectivamente), com vector vazio (pTargetT), ou com veículo de solução (veículo). O soro de animais individuais foi testado em *arrays* de mielina, e os resultados foram analisados através de algoritmos de agrupamento e de significância estatística. Representado em (A) o mapa de reactividade agrupado para antígenos com significância estatística (SAM valor $q < 0,05$) e para grupos de tratamento. Cada coluna representa os resultados de um único animal experimental, e cada fila o resultado para um antígeno; a reactividade está mostrada em cor segundo a escala de reactividade anexa. A taxa de surtos para cada grupo encontra-se representada na porção inferior da Figura. Em (B) estão representados os resultados de uma experiência separada de tratamento com o minigene PLP139-151 ou com veículo de solução (PBS) durante 6 semanas, após as quais soro foi retirado e analisado utilizando o mesmo protocolo.

grupos tratados não têm reactividade significativa. O auto-agrupamento observado para os animais vacinados com constructos de mielina (e que corresponde ao fenómeno biológico de resposta ao tratamento) foi, também, menos evidente nos grupos de controlo, o que é consistente com a variabilidade interindividual natural da EAE. Em comparação com estes

dois grupos de tratamento, a vacinação com o minigene PLP139-151 resultou numa menor redução da diversificação da resposta humoral autoimune (Figura 28B), tal como tinha evidenciado menor eficácia na redução da taxa de surtos. Estes resultados confirmaram a relação, descrita acima, entre a taxa de surtos e a diversificação de epítomos na EAE crónica, mas também que um dos mecanismos de acção das vacinas de ADN, particularmente no que diz respeito à sua capacidade de redução da taxa de surtos em experiências de tratamento e não de prevenção da doença, está relacionado com a supressão da resposta linfocitária B. Comparativamente com os resultados até então obtidos, e descritos anteriormente, este mecanismo de acção das vacinas de ADN acrescenta dados muito significativos para a compreensão desta terapia. A influência das vacinas de ADN sobre a produção de anticorpos auto-reactivos contra antígenos de mielina poderá ser um dos principais benefícios terapêuticos desta modalidade terapêutica, e só pôde ser revelada nestas experiências graças à utilização de tecnologia sensível para a detecção de respostas *multiplex*, como é a dos *arrays* de mielina. Igualmente, uma vez que estes permitiram, até certo ponto, prever a evolução clínica, é, em teoria, possível, desenhar vacinas de ADN com base no padrão de reactividade no primeiro surto de doença, e que permitissem evitar a diversificação humoral subsequente e, em consequência, reduzir a gravidade da doença.

Numa experiência de tratamento com vacinação de ADN, realizada posteriormente, procurámos estudar melhor a resposta linfocitária T, no sentido de confirmar os achados anteriores respeitantes à modificação de fenótipo encontrada com a vacinação de longo termo. Para tal, utilizámos novamente o modelo de EAE crónica com surtos em ratinhos SJL/J induzidos com o péptido PLP139-151. Nesta experiência, optámos por concentrarmo-nos, apenas, nos grupos de tratamento com o minigene PLP139-151, e na combinação multigénica *cocktail*, ambas com adição da vacina IL-4, em comparação com um grupo de controlo vacinado com vector vazio. A meio da experiência, eliminámos cerca de metade dos animais

experimentais para avaliação da resposta linfocitária T, pelo que se perdeu a randomização inicialmente feita; como tal, os resultados clínicos perdem alguma relevância após este ponto. Como se pode observar (Figura 29), até ao momento da retirada dos animais, existiu uma tendência para o grupo tratado com a combinação multigénica recuperar mais rapidamente do primeiro surto de desmielinização (com três pontos de significância estatística em relação ao controlo com vector vazio – dia 23, Mann-Whitney $p \leq 0.03$ e dias 27 e 28, Mann-Whitney $p \leq 0.02$). Após a remoção de cerca de metade do grupo experimental (10 animais para o grupo controlo, 8 para o grupo PLP139-151+IL-4 e 7 para o grupo *cocktail*+IL-4), as diferenças entre grupos experimentais tornaram-se menos evidentes, havendo, no entanto, alguns pontos em que houve diferenças estatisticamente menos significativas entre os grupos de tratamento com o minigene PLP139-151 e a combinação multigénica (Mann-Whitney $p \leq 0.1$ assinalado na Figura). No dia 30 pós-indução de doença, procedeu-se à avaliação da resposta linfocitária T através de ensaios de proliferação e de fenotipagem por padrão de secreção de citocinas. No que diz respeito à capacidade proliferativa dos linfócitos T, observa-se que, uma vez mais, não existe evidência de diversificação de epítomos da resposta T para outros antígenos de mielina (Figura 30). Mais ainda, houve supressão da capacidade proliferativa linfocitária nos grupos tratados com vector vazio e com a combinação do minigene PLP139-151 e da vacina IL-4; este efeito foi sobretudo observável para o tratamento com o minigene, à semelhança do que tinha já sido observado nas experiências de prevenção de EAE com a utilização desta vacina. Em comparação com estes dois grupos, o tratamento com a combinação multigénica *cocktail* e IL-4 não causou efeitos significativos na capacidade de proliferação linfocitária.



	n	Incidência pré-vacinação (%)	Pontuação máxima pré- vacinação	Pontuação dia 30	Pontuação dia 40	Pontuação dia 50
pTarget	20 (10)	70	1.6 ± 1.43	1 ± 1.25	1.1 ± 1.66	1 ± 1.22
PLP139- 151+IL-4	18 (10)	78	2 ± 1.19	0.83 ± 1.15	1.2 ± 0.92	1.3 ± 1.41
Cocktail+IL4	16 (9)	69	1.72 ± 1.45	0.5 ± 0.97	0.78 ± 1.3	0.77 ± 1.20

Figura 29. Tratamento da EAE crónica em ratinhos SJL/J por vacinação multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com o péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.), e randomizados após recuperação do primeiro surto clínico para receberem tratamento com o vector vazio (pTarget, n=20), o minigene PLP139-151 (n=19) ou a combinação multigénica MBP+MOG+MAG+PLP (cocktail, n=16), ambos adicionados ao constructo IL-4. O tratamento foi realizado por injeção semanal intramuscular de ADN (quantidades idênticas às da experiência anterior) entre os dias 16 e 51 da doença (zona cinzenta no gráfico). Após o dia 30 (linha negra) foram retirados animais para realização de fenotipagem linfocitária ficando os grupos reduzidos a metade (pTarget n=10, PLP139-151+IL-4 n=10, cocktail+IL-4 n=9). Os resultados mostrados são a média das pontuações clínicas diárias para cada grupo ao longo da experiência; assinalados com estrela branca os pontos com diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e cocktail+IL-4 (Mann-Whitney $p \leq 0.05$) ou entre os grupos PLP139-151+IL-4 e cocktail+IL-4 (Mann-Whitney $p \leq 0.10$). Na tabela anexa estão representadas as pontuações médias ± desvio padrão para cada grupo de tratamento antes e depois do início da vacinação.

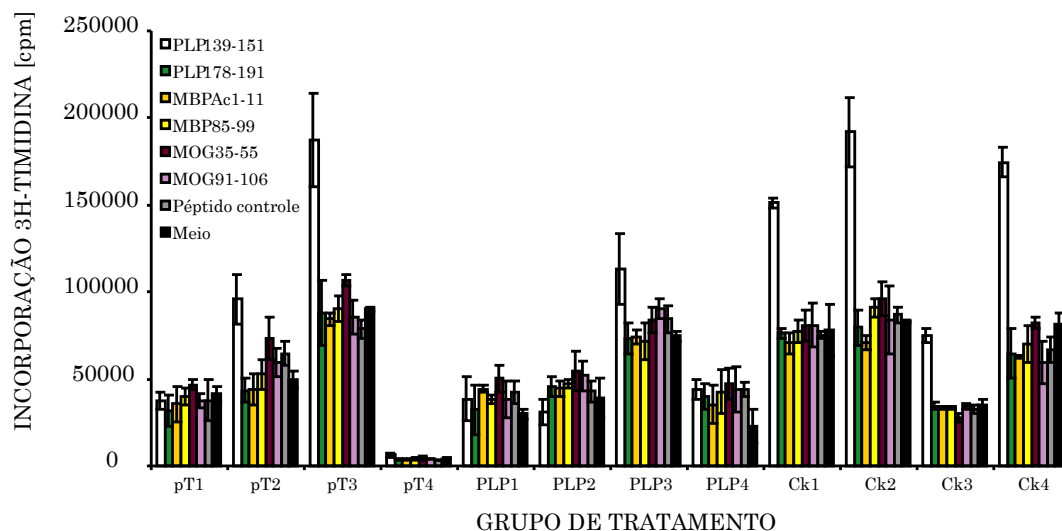


Figura 30. Ensaio de proliferação de linfócitos periféricos aos 30 dias depois da indução de EAE em ratinhos SJL/J tratados com vacinação multigênica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina. A partir de animais da experiência anterior, os gânglios linfáticos de drenagem de animais individuais de cada grupo de tratamento (vector vazio pTarget – pT1-4 -, PLP139-151+IL-4 – PLP1-4 -, cocktail+IL-4 – Ck1-4 -) foram dissecados, culturas celulares estabelecidas e a proliferação testada na presença do péptido cognato (PLP139-151), outros péptidos de mielina (PLP178-191, MBPAc1-11, MBP85-99, MOG35-55, MOG91-106), péptido controle (Vβ5.1) e concanavalina A. Os resultados mostrados são a média das contagens por minuto (cpm) + desvio padrão de amostras triplicadas para cada péptido (0.5x10⁶ células/poço, todos os péptidos a 10 µg/ml). Valores de proliferação na presença de concanavalina A (Con A, 2 µg/ml) não mostrados (pT1 322316 ± 18008,5; pT2 127864,8 ± 8178; pT3 107542,2 ± 25784,9; pT4 42492,5 ± 3660,8; PLP1 141656,6 ± 92003,5; PLP2 145756,5 ± 26142,1; PLP3 220204,3 ± 20672,4; PLP4 207392 ± 45492,2; Ck1 103256,5 ± 19676,4; Ck2 102654,9 ± 18811,8; Ck3 142186,1 ± 111024,5; Ck4 104867,6 ± 12014,1).

Quando avaliámos a capacidade de produção de citocinas por parte de linhas celulares T derivadas de linfócitos periféricos no dia 30 pós-indução de doença, encontrámos, uma vez mais, uma mudança fenotípica Th inesperada (Figura 31A). Dos três grupos de tratamento, a utilização da vector vazio pTarget levou ao maior enviesamento Th2, manifestado pela produção de grandes quantidades de citocinas Th2 como a IL-4 ou a IL-10. Em comparação com este grupo, as linhas celulares T derivadas da utilização do minigene PLP139-151 e IL-4 mostraram uma menor capacidade de produção de IL-4 ou 10, e um aumento da produção de IFN γ ; no grupo de tratamento com o *cocktail* multigénico e IL-4, este efeito foi

ainda mais evidente, tendo sido detectada a maior produção de IFN γ e a menor de IL-4. Note-se, no entanto, que não temos nesta experiência um grupo de comparação sem vacinação, pelo que não sabemos até que ponto a vacinação levou a modificações do fenótipo T gerado normalmente; podemos apenas comparar grupos tratados. Olhando para os dados utilizando razões Th1/Th2 (Figura31B), o fenómeno de enviesamento torna-se ainda mais evidente; as diferenças entre os dois grupos de tratamento com constructos de mielina são, nesta análise, apenas relevantes para o ratio IFN γ /IL-4 e não para o IFN γ /IL-10.

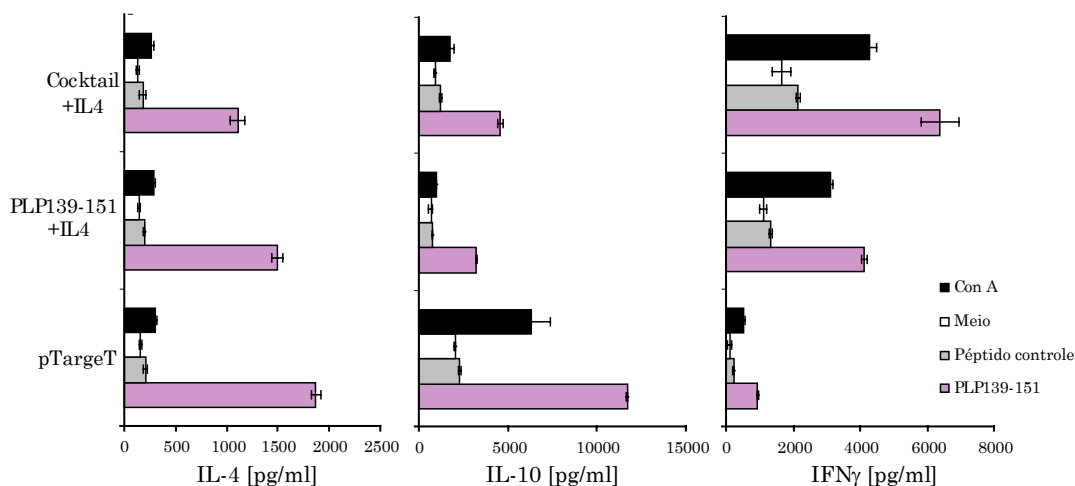


Figura 31A. Ensaio de produção de citocinas a partir de linhas celulares T derivadas de ratinhos SJL/J tratados com vacinação multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina, 30 dias depois da indução de EAE. A partir de animais da experiência anterior, os gânglios linfáticos de drenagem de animais individuais de cada grupo de tratamento (vector vazio pTargeT, PLP139-151+IL-4, cocktail+IL4) foram dissecados, e linhas celulares T mantidas *in vitro* durante 2 ciclos de estimulação, após o qual a capacidade de produção de citocinas (IL-4, IL-10, IFN γ) foi testada por reacção ELISA na presença do péptido cognato (PLP139-151, 10 μ g/ml), péptido controlo (HSVP16, 10 μ g/ml) e concanavalina A (Con A, 2 μ g/ml). Os resultados mostrados são a média das concentrações de citocinas \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

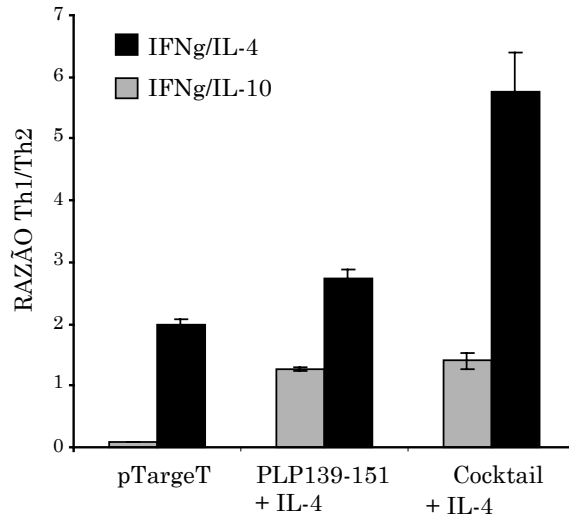


Figura 31B. Ensaio de produção de citocinas a partir de linhas celulares T derivadas de ratinhos SJL/J tratados com vacinação multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina, 30 dias depois da indução de EAE. Razão Th1/Th2 exprimindo o enviesamento do fenótipo Thelper para os três grupos de tratamento (pTargeT, PLP139-151+IL-4, Cocktail+IL-4) de linhas celulares mantidas *in vitro* durante dois ciclos de estimulação.

No que diz respeito à resposta de anticorpos, resolvemos avaliar a produção de anticorpos, de diferentes isotipos, anti-PLP139-151, por método ELISA. Aos 30 dias pós-imunização, retirámos sangue periférico do qual foi extraído soro, e quantificámos a presença de IgG anti-PLP139-151, dos isotipos IgG1 e IgG2a, em amostras individuais; estes isotipos foram escolhidos como marcadores de resposta predominantemente Th1 (IgG2a) ou Th2 (IgG1). Como se pode observar (Figura 32), encontrámos, novamente, o mesmo fenómeno de enviesamento da resposta, com valores significativamente superiores de IgG2a e inferiores de IgG1 para animais tratados com a combinação *cocktail* e IL-4, em comparação com os outros dois grupos. No final da experiência (dia 60), voltámos a testar o soro de animais individuais, nesta altura para a presença de IgG total, e a determinar os títulos de IgG contra algumas proteínas e péptidos de mielina (Figura 33). Neste caso, testámos a presença de anticorpos contra homogeneizado de medula espinhal (HME), proteína MBP, e os antígenos secundários PLP179-191, MOG35-55 e MBP7-21. Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais, pode-se observar uma tendência para redução do título total de IgG, de anticorpos anti-HME e anti-PLP179-191 no grupo tratado com a combinação multigénica *cocktail*+IL-4, e para a redução do título anti-MBP

e anti-MOG35-55 no grupo tratado com o minigene PLP139-151+IL-4. O objectivo destas experiências foi de confirmar, independentemente, os resultados obtidos através das experiências de *arrays* mencionadas anteriormente; se compararmos estes resultados com os obtidos nos *arrays*, observámos um bom grau de correlação entre ambos.

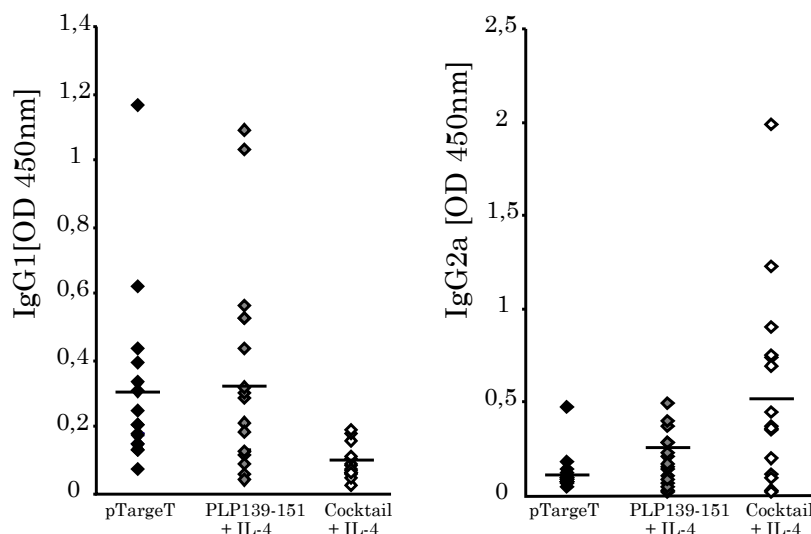


Figura 32. Isotipagem de anticorpos presentes no soro de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por administração de com vacinas multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina. Soro foi colhido de animais individuais de cada grupo de tratamento 30 dias depois da indução de EAE por imunização com PLP139-151 em ACF (pTargetT, n=17, PLP139-151+IL-4, n=17, Cocktail+IL-4, n=16). A presença de anticorpos anti-PLP139-151 foi determinada em cada amostra individual por ensaios ELISA para a detecção de anticorpos dos isotipos IgG1 e IgG2a (todas as amostras diluídas a 1:20 em tampão de diluição). Os resultados estão expressos em gráfico representando para cada grupo experimental o resultado da quantificação de cada isotipo, para cada animal (◆ em preto, cinzento e branco, correspondendo ao valor médio de duplicados) em densidade óptica (OD 450nm); a barra representa o valor médio para cada grupo. Mostrado o valor de significância estatística entre o grupo vacinado com vector vazio e cocktail+IL-4 (teste t-Student, 2 caudas, 2 amostras de variância igual).

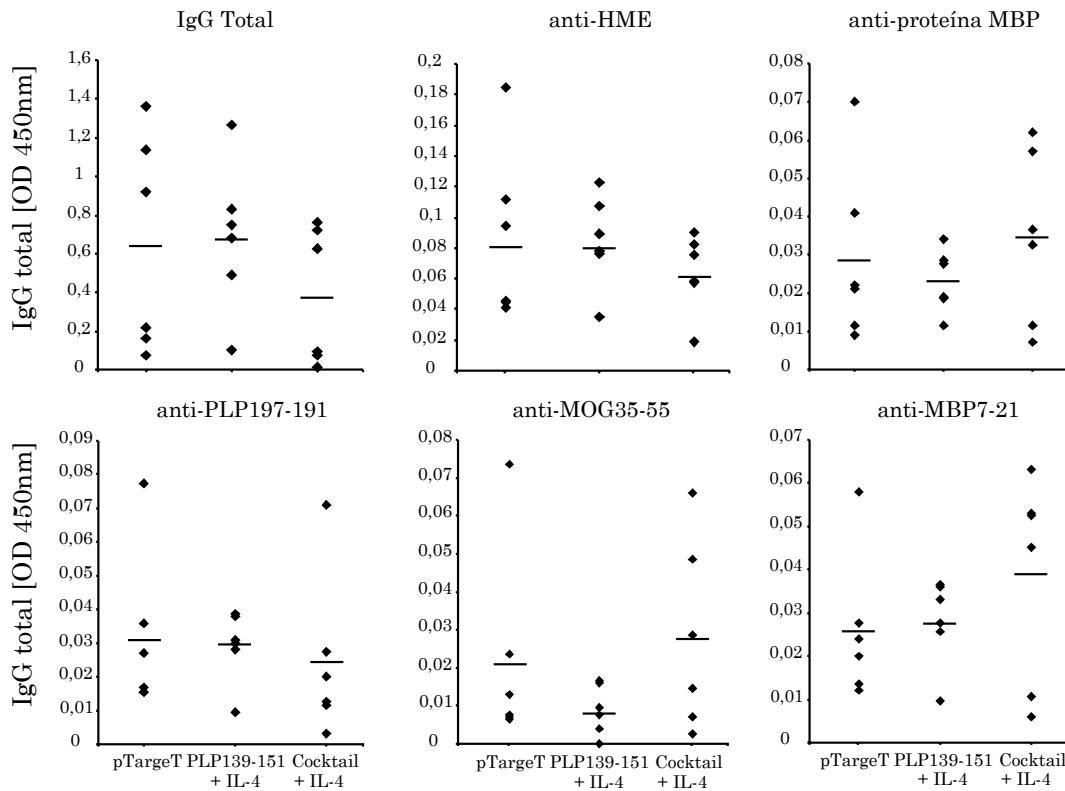


Figura 33. Doseamento de anticorpos anti-mielina presentes no soro de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por administração de com vacinas multigénica/cocktail com ADN codificador de proteínas de mielina. No final da experiência, foi colhido soro de animais individuais para cada grupo (pTargetT, PLP139-151+IL-4, Cocktail+IL-4, n=6 para todos os grupos) e testado para a presença de níveis totais de IgG, e IgG contra homogeneizado de medula espinhal (HME), proteína MBP, e três antígenos *minor* encontrados nos *arrays* de mielina (PLP178-191, MOG35-55, MBP7-21). Os resultados estão expressos em gráfico representando para cada grupo experimental o resultado da quantificação de IgG total para cada animal (◆, correspondendo ao valor médio de duplicados) em densidade óptica (OD 450nm); a barra representa o valor médio para cada grupo.

No final destas experiências, utilizando de combinações multigénicas de vacinas de ADN no tratamento de modelos de EAE crónica com surtos, podemos afirmar que: a) as combinações *cocktail* multigénicas de constructos de mielina levam a uma redução da taxa de surtos, e que esta redução é potenciada pela adição do constructo IL-4; b) não existe uma modificação significativa da capacidade proliferativa dos linfócitos T contra o antígeno cognato, pelo que o mecanismo de acção destas vacinas não é a anergização ou supressão proliferativa das células T; c) o tratamento crónico

com a combinação multigénica *cocktail* leva a um enviesamento Th1 da resposta linfocitária, observável no padrão de secreção de citocinas por parte de linhas celulares T, mas também pelo padrão de produção de anticorpos anti-mielina; d) existe uma forte correlação entre a redução da taxa de surtos pelo tratamento com vacinas de ADN e a redução da diversificação de epítomos da resposta humoral autoimune, detectada pela aplicação de uma nova tecnologia de análise múltipla de auto-reactividade, os *arrays* de mielina.

8. Utilização de vacinação multigénica/*cocktail* com ADN codificador de proteínas de mielina na prevenção de modelos de EAE crónica.

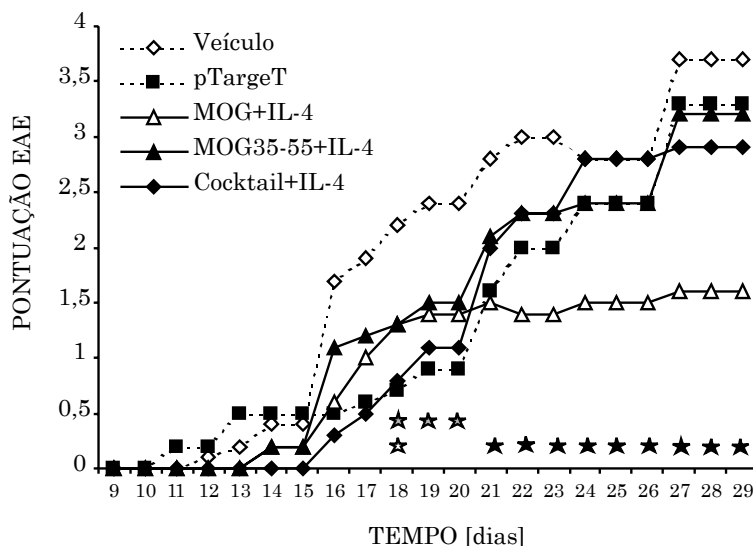
Dada a eficácia na redução da taxa de surtos em modelos de EAE crónica, demonstrada pela vacinação com a combinação multigénica *cocktail*, sobretudo quando se adiciona a esta a vacina IL-4, decidimos testar a sua eficácia na prevenção da doença. Mencionámos, anteriormente, que a vacinação com o minigene MOG35-55 não obteve a mesma eficácia na prevenção da EAE, no modelo induzido em ratinhos C57BL/6, em comparação com a vacina MOG e, sobretudo, à combinação de vacinas MOG+IL-4 (ponto 2, Figura 4 a 7). Este facto levou-nos a propor um paradigma em que a redução do número de epítomos codificados pelas vacinas de ADN poderia dar lugar a diversificação da resposta para outros antígenos de mielina. Seguindo esse mesmo raciocínio, a vacinação com a combinação multigénica/*cocktail* deveria ser mais eficaz do que a vacinação com o constructo MOG, uma vez que, potencialmente, também estaríamos a suprimir a resposta linfocitária contra epítomos codificados nas proteínas MBP, MAG e PLP, para além da MOG. Para testar essa hipótese, fizemos uma experiência de prevenção da EAE comparando três estratégias de vacinação, nomeadamente, com o minigene MOG35-55, o gene MOG e a combinação multigénica/*cocktail*, todos eles adicionados ao constructo IL-4. Como controlos, utilizámos apenas um grupo não-vacinado, e outro vacinado

com vector vazio; tal como anteriormente foi demonstrado, a vacinação com o constructo IL-4, isoladamente, não tem qualquer eficácia terapêutica na prevenção ou tratamento da EAE.

Como se pode observar da evolução clínica dos animais vacinados (Figura 34), a melhor das três estratégias de tratamento empregues foi a vacinação com a combinação MOG+IL-4, que levou a uma estabilização do curso clínico, após a fase inicial, e até ao final do tratamento, bem como a uma redução da incidência máxima e sobretudo da taxa de mortalidade (Figura 34, tabela anexa). Comparativamente com este grupo, a vacinação com a combinação multigénica não demonstrou eficácia na prevenção da EAE, havendo apenas, inicialmente, um atraso no aparecimento da doença; com a progressão do tempo, no entanto, as pontuações clínicas médias, e a incidência, tornaram-se idênticas às do grupo não vacinado. No que diz respeito à vacinação com o minigene MOG35-55, esta não teve qualquer eficácia na prevenção; já em experiências anteriores tínhamos mostrado a sua falta de eficácia quando utilizada isoladamente, e nesta experiência, também, a sua inutilidade quando empregue em co-vacinação com o constructo IL-4. Em relação à taxa de mortalidade, quer a vacinação com *cocktail*+IL-4, quer com o minigene MOG35-55+IL-4 demonstraram uma redução parcial em comparação com o grupo controlo não vacinado. Por último, a vacinação com o vector vazio pTargetT, nesta experiência, resultou, inicialmente, numa melhoria em relação ao controlo não-vacinado.

Já, no decorrer deste trabalho, apresentámos dados respeitantes à utilização deste vector como grupo de controlo em várias experiências (Figuras 2 a 7, 9, 12, 15, 18, 29 a 33); no seu conjunto, estes dados apontam para efeitos imunomoduladores da utilização deste vector, não determinados pelo constructo por ele codificado. Em experiências de prevenção no modelo de EAE crónica em ratinhos C57BL/6, a vacinação com este vector vazio resultou, num caso, numa ligeira melhoria das pontuações clínicas (Figura 4 e 5), concomitantemente com a demonstração de algum enviesamento Th2 (Figura 7), enquanto que noutro não teve qualquer efeito benéfico (Figura 2 e 3). Em relação ao modelo de EAE em ratinhos SJL/J, a sua utilização na

prevenção não teve, igualmente, eficácia (Figura 9). No que diz respeito ao tratamento da EAE estabelecida, nas experiências iniciais com o modelo C57BL/6, a vacinação com o vector vazio não teve eficácia (Figura 15); por outro lado, nas experiências de tratamento de longo termo no modelo SJL/J (Figura 18 e 29), esta terapêutica resultou mesmo num aumento da taxa de surtos. Nestas experiências, no entanto, foi possível demonstrar que a utilização de longo termo deste vector como terapêutica resultou num enviesamento Th2 da resposta linfocitária T (Figura 31A). Ou seja, dependendo do modelo empregue, é possível observar efeitos terapêuticos potencialmente benéficos da vacinação com vector vazio, tal como nesta experiência de prevenção.

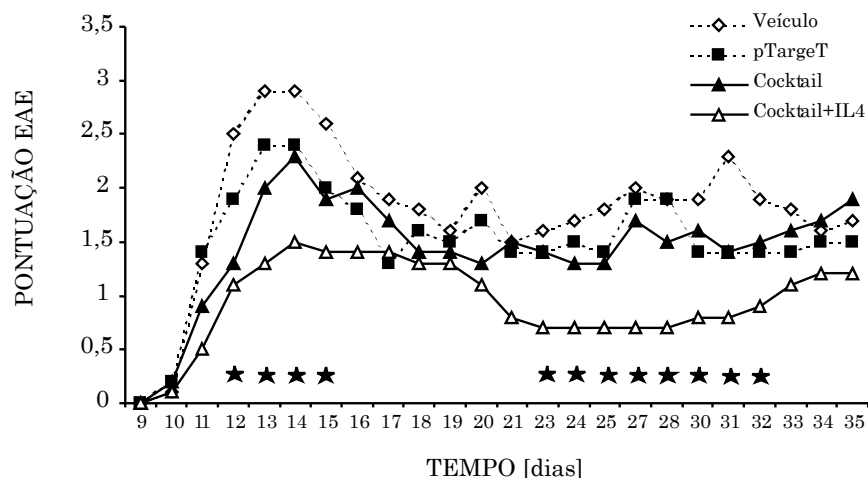


Vacina de ADN	n	Incidência máxima %	Pontuação máxima	Taxa mortalidade %
Veículo	10	100	3.7 ± 1.41	50
pTargeT	10	100	3.3 ± 1.49	40
MOG+IL-4	10	80	1.6 ± 1.42	10
MOG35-55+IL-4	10	100	3.2 ± 1.13	20
Cocktail+IL-4	10	100	2.9 ± 1.22	20

Figura 34. Prevenção da EAE em C57BL/6 por vacinação de ADN com combinação multigénica/cocktail. Ratinhos C57BL/6 foram induzidos com EAE por imunização com emulsão do péptido MOG35-55 (100 µg/animal/i.m.) em ACF e PTX (200 ng/animal/e.v. em duas doses com 48 horas de intervalo a partir da data de imunização). Nos dias -14 e -7 antes da data de indução, os ratinhos foram vacinados com uma combinação multigénica de constructos de mielina (Cocktail - MBP, MOG, MAG, PLP 50 µg/constructo/animal/i.m.), o constructo MOG (100 µg/animal/i.m.) ou o minigene MOG35-55 (100 µg/animal/i.m.), todos com adição do constructo IL-4 (50 µg/constructo/animal/i.m), e como grupos de controlo

vacinação com vector vazio (pTarget – 100 µg/animal/i.m), ou com veículo de solução apenas. O gráfico representa a evolução da pontuação clínica média de cada grupo, encontrando-se assinalados com asterisco (branco – cocktail+IL-4; cinzento – pTarget; preto - MOG+IL-4) os dias com diferenças estatisticamente significativas de pontuação entre o grupo não vacinado e os grupos de tratamento (valor $p < 0.05$, teste de Mann-Whitney). Na tabela anexa, estão mostrados os valores da incidência máxima de doença, a pontuação máxima \pm desvio padrão atingida no pico da doença e a taxa de mortalidade cumulativa para cada grupo experimental.

Numa segunda experiência de prevenção, utilizando a combinação multigénica/*cocktail*, mas, neste caso, no modelo de EAE em ratinhos SJL/J, pudemos constatar que esta estratégia terapêutica teve eficácia considerável, mas apenas quando associada ao constructo IL-4 (Figura 35), uma vez que a vacinação com o *cocktail* isoladamente não teve qualquer efeito no curso clínico da doença. Neste caso, a vacinação com o vector vazio não teve, igualmente, qualquer efeito observável sobre a evolução da doença.



Vacina de ADN	n	Incidência máxima %	Pontuação máxima	Valor p
Veículo	10	100	2.9 \pm 0.73	0.016
pTarget	9	90	2.4 \pm 1.22	0.035
Cocktail	10	90	2.3 \pm 0.82	0.086
Cocktail+IL-4	10	70	1.5 \pm 1.26	-

Figura 35. Prevenção da EAE em ratinhos SJL/J por vacinação de ADN com combinação multigénica/cocktail. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com emulsão do péptido PLP139-151 (100 µg/animal/i.m.) em ACF. Nos dias – 14 e –7 antes da data de indução, os ratinhos foram vacinados com uma combinação multigénica de constructos de mielina (Cocktail - MBP, MOG, MAG, PLP 50 µg/constructo/animal/i.m.) com ou sem adição do constructo IL-4 (50 µg/constructo/animal/i.m), com vector vazio (pTarget – 100 µg/animal/i.m), ou com veículo

de solução apenas. O gráfico representa a evolução da pontuação clínica média de cada grupo, encontrando-se assinalados com asterisco preto os dias com diferenças estatisticamente significativas de pontuação entre o grupo não vacinado e o grupo Cocktail+IL-4 (valor $p < 0.05$, teste de Mann-Whitney). Na tabela anexa, estão mostrados os valores da incidência máxima de doença, a pontuação máxima \pm desvio padrão atingida no pico da doença e comparação neste dia entre as pontuações de cada grupo contra a pontuação do grupo Cocktail+IL-4 (valor p , teste de Mann-Whitney).

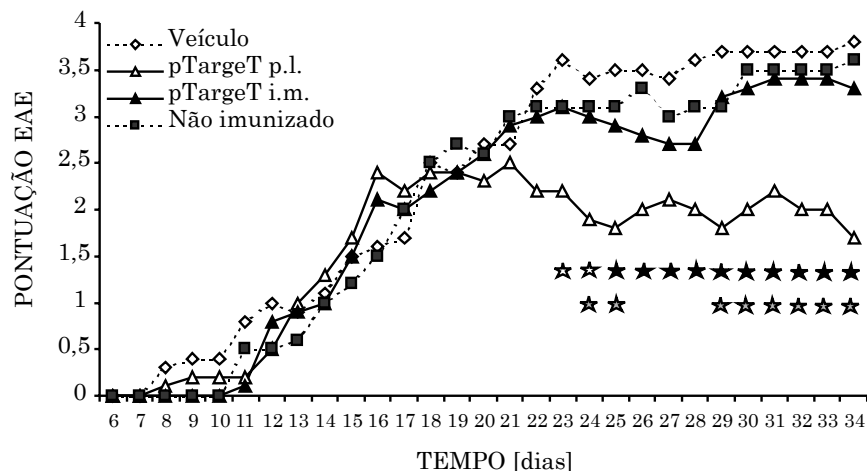
Em conclusão, podemos afirmar que a vacinação com a combinação multigénica de vacinas de ADN *cocktail*+IL-4 demonstrou eficácia na prevenção da EAE apenas no modelo SJL/J, enquanto que para o modelo C57BL/6, a vacinação com o constructo MOG+IL-4 foi superior a qualquer outra forma de terapêutica. As diferenças de eficácia da mesma terapêutica em modelos diferentes de EAE não são, talvez, inesperadas, considerando as diferenças intrínsecas nos protocolos de indução da doença nas duas estirpes, bem como nos seus próprios sistemas imunes. Mais ainda, teremos, sempre, de ter em conta os efeitos imunomoduladores intrínsecos ao ADN bacteriano, devidos, nomeadamente, à presença de sequências imunomoduladoras que podem, consoante o vector empregue, a estratégia de vacinação (prevenção *vs.* tratamento), e a estirpe, condicionar a resposta imune final.

9. Efeitos imunomoduladores do ADN bacteriano: utilização de sequências imunoestimuladoras e imunossupressoras na prevenção e tratamento da EAE.

Tal como discutimos anteriormente, tornou-se aparente, no decurso das experiências realizadas para a prevenção e tratamento de modelos de EAE em ratinhos, que a utilização de vacinas de ADN poderia ter dois efeitos distintos no sistema imune: antigénio-específicos, relacionados com o constructo codificado, e não antigénio-específicos, relacionados com a capacidade intrínseca do ADN bacteriano estimular o sistema imune. Esta capacidade, mediada sobretudo por sequências CpG (5'-purina-purina-citosina-fosfato-guanina-pirimidina-pirimidina-3') não metiladas, actuando no receptor TLR9, tem sido explorada como forma de potenciar a reacção

imune, no caso de vacinas contra diversos agentes microbianos e no cancro. No entanto, em várias experiências de vacinação com ADN para a prevenção da EAE (11, 30) a presença de motivos CpG foi considerada importante para a eficácia terapêutica das vacinas de ADN, e a utilização de vectores “vazios” produziu efeitos imunomoduladores benéficos na EAE. Em nenhuma das experiências reportadas, no entanto, o vector por nós elegido como base para os nossos constructos de ADN – pTarget - tinha sido utilizado, facto relevante, tendo em conta as diferenças de sequência entre os vectores de clonagem.

No seguimento das experiências acima descritas, em que o vector tinha sido utilizado como grupo de controlo para outras experiências de vacinação, decidimos realizar uma experiência dedicada apenas a avaliar a sua eficácia como agente terapêutico. Uma vez que a via de administração das vacinas de ADN tem influência possível sobre a eficácia terapêutica das vacinas, por induzir, preferencialmente, respostas Th1 ou Th2, comparámos a administração intramuscular do vector pTarget (via por nós habitualmente utilizada em todas as experiências anteriores) e a administração subcutânea/perilinfática. A utilização de vacinas de ADN por via intralinfática foi reportada como sendo muito mais eficaz, necessitando de quantidades muito menores de ADN para conseguir o mesmo efeito terapêutico, em comparação com a vacinação intramuscular ou intradérmica (31). No nosso caso, optámos por uma forma de administração subcutânea na vizinhança dos principais grupos ganglionares linfáticos superficiais no ratinho, a região axilar e inguinal, pelo que denominámos esta via de perilinfática (p.l.). De maneira a avaliar a eficácia terapêutica deste vector, vacinámos ratinhos C57BL/6 uma semana antes, e, novamente, na data da indução de EAE, utilizando o protocolo habitual, após o qual os ratinhos foram seguidos para determinar a sua evolução clínica. Os resultados desta experiência confirmaram que a vacinação com o vector pTarget tem efeitos imunomoduladores benéficos potenciais, sobretudo quando é utilizada a via perilinfática (Figura 36 e 37).



Vacina de ADN	n	Incidência máxima %	Pontuação Dia 16	Pontuação dia 34	Taxa mortalidade %
Veículo	10	100	1.6 ± 1.07	3.8 ± 1.39	50
pTargeT p.l.	10	100	2.4 ± 1.26	1.7 ± 0.67	0
PTargeT i.m.	10	100	2.1 ± 1.72	3.3 ± 1.49	40
Não vacinados	10	100	1.5 ± 1.71	3.6 ± 1.57	50

Figura 36. Prevenção da EAE em ratinhos C57BL/6 por vacinação com ADN contendo apenas vector vazio por diferentes vias de administração. Ratinhos C57BL/6 foram induzidos com EAE por imunização com emulsão do péptido MOG35-55 (100 µg/animal/i.m.) em ACF e PTX (200 ng/animal/e.v. em duas doses com 48 horas de intervalo a partir da data de imunização). Nos dias-7 antes da data de indução e no próprio dia de indução, os ratinhos foram vacinados com o vector vazio pTargeT por via intramuscular (pTargeT i.m. 100 µg/animal/i.m.) ou perilinfática (pTargeT p.l. 100µg/animal/p.l. dividindo a dose total por quatro grupos linfáticos, 2 axilares e 2 inguinais). O gráfico representa a evolução da pontuação clínica média de cada grupo, encontrando-se assinalados com asterisco os dias com diferenças estatisticamente significativas de pontuação (valor $p < 0.05$, teste de Mann-Whitney) entre o grupo vacinado com pTargeT p.l. e os grupos de controlo não vacinados e vacinados com veículo de solução ou vector intramuscular (asterisco branco – diferença apenas contra o grupo veículo; asterisco preto – diferença contra ambos os grupos de controlo; asterisco cinzento – diferença contra entre o vector intramuscular e perilinfático). Na tabela anexa, estão mostrados os valores da incidência máxima de doença, a pontuação nos dias 16 (pico inicial da doença) e 34 (final) ± desvio padrão e a taxa de mortalidade cumulativa para cada grupo experimental.

Nos ratinhos vacinados desta forma, assistiu-se a uma redução da gravidade da doença, manifestada sobretudo por uma estabilização do curso clínico após o pico inicial, e a uma redução considerável da taxa de mortalidade (Figura 36). A avaliação do fenótipo linfocitário T nesta experiência, baseado na capacidade de produção de citocinas, revelou que a vacinação perilinfática com pTargeT resultou num enviesamento Th2, manifestado por uma maior produção de IL-4 em relação aos controlos não

vacinados. A utilização do mesmo vector intramuscularmente teve o efeito oposto, causando uma diminuição da produção desta citocina, e consequentemente um desvio Th1 (Figura 37). A disparidade entre os efeitos imunofisiológicos destas duas vias de administração de vacinas de ADN, bem como o indubitável potencial imunomodulador das sequências CpG presentes na sequência do vector ilustra os potenciais efeitos perturbadores do vector de vacinação sobre a eficácia desta terapêutica, e justifica alguma da variabilidade nos resultados observados nas diversas experiências reunidas neste trabalho, bem como nos reportados na literatura.

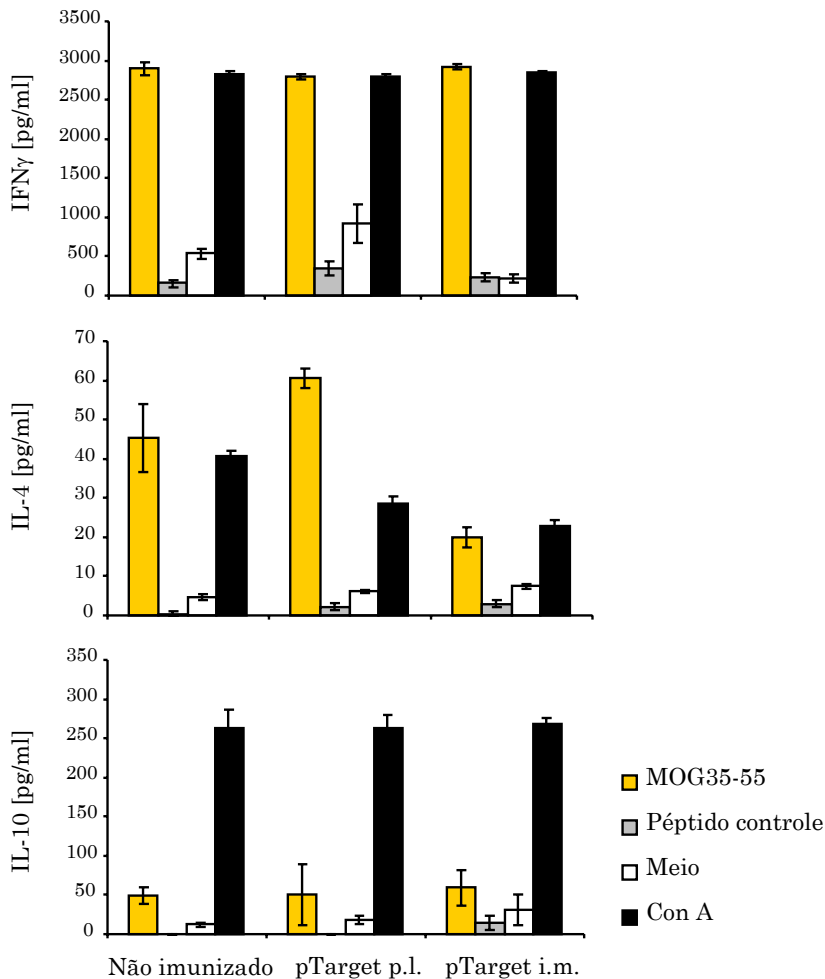


Figura 37. Produção de citocinas por linfócitos totais de ratinhos C57BL/6 vacinados com o vector pTarget por vias diferentes antes da indução de EAE. A partir dos animais da experiência anterior, os gânglios linfáticos de drenagem de cada grupo de tratamento (não vacinados, pTarget intramuscular – i.m. -, pTarget perilinfático – p.l. -) foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas *in vitro* e a capacidade de produção de citocinas (IL-4, IL-10, IFN γ) foi testada por ensaio ELISA na presença do péptido cognato (MOG35-55, 10 μ g/ml), péptido controle (V β 5.1, 10 μ g/ml) e concanavalina A (Con A, 2 μ g/ml). Os resultados mostrados são a média das concentrações \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

A activação do sistema imune inato no contexto da Esclerose Múltipla e da EAE tem assumido, recentemente, importância crescente. Vários elementos da resposta imune associados ao sistema inato – tal como a deposição de elementos da cascata do complemento e a activação de macrófagos – foram identificados, localmente, nas zonas de desmielinização activa no SNC de doentes com EM (32-34). Existe, igualmente, uma associação bem conhecida entre várias doenças infecciosas e o despoletar de reacções desmielinizantes potentes, como é o caso da encefalomielite pós-vacinal e pós-infecciosa, e da leucoencefalite hemorrágica de HURST, bem como entre estímulos infecciosos e a ocorrência de surtos na EM, o que implica, uma vez mais, a reacção do sistema imune inato contra agentes microbianos no despoletar de mecanismos efectores patogénicos nas doenças desmielinizantes (conforme revisto no Capítulo I). Nos modelos de EAE a participação deste componente do sistema imune é inerente ao próprio processo da sua génese. A EAE, tal como discutimos anteriormente, é uma doença induzida em estirpes e espécies susceptíveis pela imunização com componentes da mielina (proteínas ou péptidos) conjuntamente com adjuvante completo de FREUND (ACF), composto de uma emulsão de óleo-em-água à qual se adicionam estirpes de micobactérias inactivadas pelo calor (35). Uns dos componentes mais imunogénicos desta mistura são, provavelmente, as sequências CpG não-metiladas, derivadas do ADN das micobactérias presentes no ACF, e que geram uma resposta imune muito intensa e desviada predominantemente para um fenótipo Th1 (36-40). Como tal, os protocolos de indução de EAE incluem, intrinsecamente, um estímulo para o sistema imune inato, capaz de activar os seus mecanismos efectores e, igualmente, de polarizar a resposta linfocitária. Por último, foi demonstrado que a presença de oligonucleótidos CpG são capazes de substituir, completamente, as funções das micobactérias inactivadas, e que activam linfócitos T encefalitogénicos *in vivo* (41).

Nos vectores bacterianos utilizados para a vacinação com ADN, a presença de motivos CpG contribui, provavelmente, para a imunogenicidade da vacina, o que é benéfico nos casos em que se pretende induzir uma

resposta Th1 forte contra agentes microbianos ou células cancerosas, mas que poderá ser deletério no contexto de doenças autoimunes. Existem, apesar disso, trabalhos na literatura referentes à utilização de motivos CpG na prevenção da EAE, no modelo induzido em ratos Lewis, e nos quais estas sequências demonstraram eficácia terapêutica (11, 30). Os nossos resultados, que mostrámos acima, sobre a utilização do vector pTarget na prevenção da EAE confirmam o potencial de modulação da resposta imune encefalitogénica, contra antígenos de mielina, por sequências de ADN bacteriano.

De forma a melhor explorar os efeitos desta imunomodulação não antígeno-específica, dentro do contexto da vacinação com ADN, e, ainda mais, tendo em conta os resultados obtidos nas experiências de vacinação de longo termo, em que demonstrámos a presença de uma polarização Th1 da resposta linfocitária T, devida, provavelmente, à administração prolongada de motivos CpG presentes no ADN bacteriano, decidimos estudar os efeitos imunomoduladores de oligonucleótidos CpG e tentar encontrar formas de bloquear os seus efeitos deletérios^f. Para tal, sintetizámos artificialmente oligonucleótidos (ODN) fosforotioados (contendo no seu esqueleto enxofre, o que evita a degradação do ADN de cadeia única) contendo um motivo CpG, e, igualmente, outros oligonucleótidos em que modificámos a sequência de forma a alterar o motivo CpG para GpG, correspondendo a uma única mudança de par de bases, bem como um oligonucleótido controlo composto apenas de citosinas (CpC). Em experiências iniciais, realizadas para testar a capacidade de estimulação da proliferação em esplenócitos totais, verificou-se que o ODN CpG foi capaz de induzir, significativamente, a proliferação destas células. A junção do ODN GpG às mesmas células, em quantidades crescentes, no entanto, levou a uma redução da proliferação provocada pelos CpG, consistente com um efeito antagonístico entre estes dois ODN. Quando o mesmo tipo de ensaio foi realizado em esplenócitos de ratinhos *knockout* para o receptor TLR9 (o receptor TLR para motivos CpG) em comparação

^f Os resultados das experiências com os oligonucleótidos CpG e GpG resultam de um trabalho de colaboração, e encontram-se publicados em HO *et al.*, *Journal of Immunology* 2003; 171:4920. Agradecemos a Peggy Ho a permissão para os utilizar.

com congêneres normais, verificou-se que, não só a capacidade de estimulação de proliferação pelo ODN CpG era totalmente dependente deste receptor (como seria de esperar), mas, também, que a capacidade antagonista do ODN GpG era igualmente dependente da presença do mesmo, implicando que ambos os ODN actuam através do TLR9. Foi, posteriormente, confirmado que a sinalização do ODN CpG através do receptor TLR9, culminando na fosforilação e activação do factor de transcrição NF- κ B e mediada pelo factor I κ B- α era diminuída pela adição do ODN GpG, tal como seria de esperar de um efeito antagonístico, e também que este ODN, por si só, não possuía capacidade aparente de activar o receptor TLR9.

De forma a avaliar o impacto funcional da presença dos ODN CpG e GpG sobre o fenótipo das células apresentadoras de antígeno e sobre os linfócitos T, foram realizados estudos de citometria de fluxo, capacidade de produção de citocinas e proliferação. No que diz respeito às células apresentadoras de antígeno, verificámos que a adição do ODN estimulador CpG conduziu a um aumento da expressão de moléculas de MHC classe II, bem como das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86. O ODN GpG, isoladamente, não produziu qualquer destes efeitos, enquanto que o ODN de controlo CpC levou a um aumento parcial de CD86. Curiosamente, o ODN GpG, e ainda mais o ODN CpC, levaram a um aumento substancial da molécula de apresentação de antígeno não-clássica CD1d (cerca de 10% de aumento para GpG, 20% para CpC), em comparação com o ODN CpG, que, pelo contrário, causou uma redução da expressão desta molécula (cerca de 10%). Em relação à capacidade proliferativa linfocitária T, foram realizados ensaios de proliferação em que as células apresentadoras de antígeno foram pré-incubadas com os ODN em estudo. Primeiramente, foram utilizadas APC de ratinhos B10.PL, que foram incubadas com o antígeno AcMBP1-11 e ODN CpG ou GpG durante 24 horas, antes de serem irradiadas de forma a impedir a sua proliferação; de seguida, foi testada a proliferação de linfócitos T naive, provenientes de ratinhos transgénicos

para o TCR-AcMBP1-11, i.e. em que mais de 70% dos linfócitos têm um receptor de célula T capaz de reconhecer o antigénio. Como se pode observar (Figura 38A), a adição do ODN CpG tem um efeito cumulativo com o da presença do péptido cognato sobre a proliferação destas células, e que é eliminado, parcialmente, pela presença do ODN GpG; por outro lado, este último ODN, por si só, não evidencia a mesma capacidade estimuladora da proliferação. De seguida, resolvemos testar o efeito destes ODN na proliferação de linhas celulares T estabelecidas; para esse efeito, utilizámos linhas celulares T derivadas de ratinhos S/JL/J imunizados com o péptido PLP139-151, e que tinham desenvolvido fenótipos Th bem diferenciados (linhas celulares T derivadas da experiência descrita nas Figuras 11 e 12). Estas linhas celulares são compostas de linfócitos T completamente diferenciados, e estimulados ciclicamente com APC singénicas irradiadas e o seu péptido cognato, sem adição de outras citocinas diferenciadoras; após estimulação antigénio específica, cada uma destas linhas celulares evidencia um fenótipo Th característico e totalmente polarizado, manifestado pela capacidade de produção de citocinas Th1 – como a IL12p40 ou IFN γ – ou Th2 – IL-4, IL-10 – de forma consistente (Figura 38D). Numa experiência idêntica à anteriormente descrita, testámos a proliferação destas linhas celulares na presença de APC singénicas irradiadas, e que tinham sido incubadas previamente com o péptido cognato (PLP139-151) e várias combinações de ODN estimulador, inibitório e controlo (Figura 38, B e C). Uma vez mais, a junção do ODN CpG teve um efeito sinérgico com o estímulo antigénio-específico do péptido sobre a capacidade proliferativa da linha celular Th1, e que foi eliminado, totalmente, pela junção do ODN GpG, mas não pela do ODN controlo CpC. Isoladamente, nenhum destes ODN demonstrou capacidade de estimulação da proliferação. No entanto, no que diz respeito à linha Th2, o efeito estimulador dos CpG não foi evidenciado, e, pelo contrário, ambos os ODN GpG e CpC demonstraram capacidade de estimulação proliferativa, que foi eliminada na presença do ODN CpG. Ou seja, no que diz respeito a estas duas linhas celulares diferenciadas e fenotipicamente diferentes, os ODN estudados têm efeitos opostos: a linha

Th1 é estimulada pelo ODN CpG, e a Th2 pelos ODN GpG e CpC; a presença de mais do que um ODN tem um efeito antagonístico sobre o outro, provavelmente devido à competição entre ODNs para o receptor TLR9.

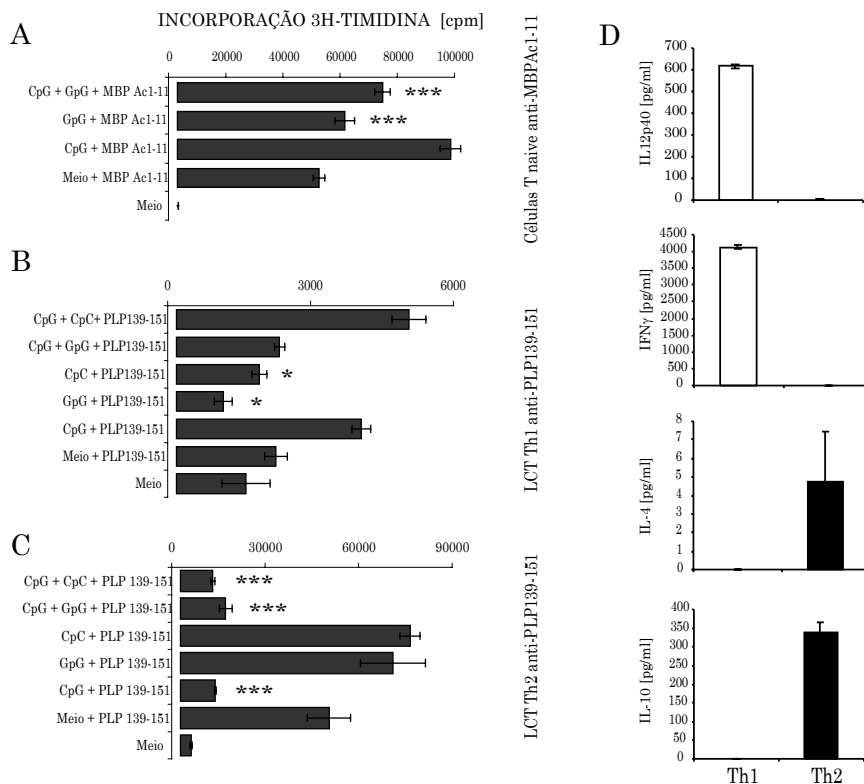


Figura 38. Ensaios de proliferação em linfócitos T naive e linhas celulares T diferenciadas após estimulação com ODN estimulatórios e inibitórios. A – Esplenócitos totais (5×10^5 células/poço) de ratinhos B10.PL naive foram incubados com o péptido MBPAcl-11 (5 μ g/ml) e o ODN indicado (5 μ g/ml) durante 24 horas antes de serem irradiados. Linfócitos T naive de ratinhos transgênicos para o TCR MBPAcl-11 num background B10.PL foram isolados por purificação em coluna CD3+ a partir dos gânglios linfáticos e baço, e adicionados às APC irradiadas (5×10^4 células/poço). A proliferação foi medida por incorporação de 3H-timidina nas últimas 16 horas de cultura; os resultados mostrados são a média (cpm) \pm desvio padrão de amostras triplicadas. B e C – Ensaio idêntico ao anterior, com esplenócitos derivados de ratinhos SJL/J naive, incubados com o ODN indicado e o péptido PLP139-151, aos quais foram adicionadas linhas celulares T (LCT) anti-PLP139-151 diferenciadas em fenótipo Th1 e Th2 (idênticas concentrações de esplenócitos, linfócitos T, péptido e ODNs). A proliferação foi medida por incorporação de 3H-timidina nas últimas 16 horas de cultura; os resultados mostrados são a média (cpm) \pm desvio padrão de amostras triplicadas. Os asteriscos identificam diferenças estatisticamente significativas (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, teste ANOVA). D – Ensaio de produção de citocinas a partir das linhas celulares T anti-PLP139-151 anteriormente empregues para confirmação de fenótipo. Ambas as linhas celulares (Th1 e Th2, 1×10^5 células/poço) foram estimuladas *in vitro* na presença de APC singênicas irradiadas (0.5×10^6 /poço) conjuntamente com o seu péptido cognato (PLP139-151, 10 μ g/ml). A secreção das citocinas IL12p40, IFN γ , IL-4 e IL-10 foi medida nos sobrenadantes por ensaio ELISA. Os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

No que diz respeito à capacidade de produção de citocinas, avaliámos, no início, o efeito da presença de CpG ou de GpG, isoladamente, sobre a produção de citocinas a partir de esplenócitos totais. Após incubação com o ODN CpG, observou-se a produção de grandes quantidades de citocinas Th1, como seja a IL12p40, IFN γ ou IL-6, sendo possível detectar também a presença de IL12p70, e da citocina Th2 IL-10 (Figura 39).

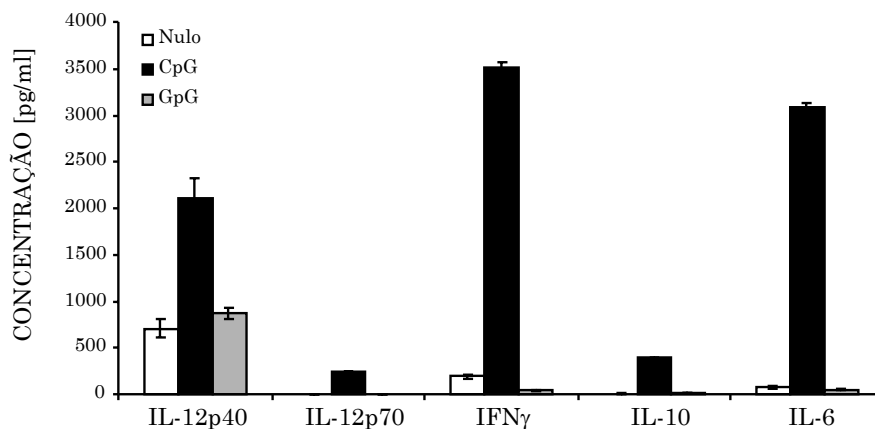


Figura 39. Ensaio de produção de citocinas a partir de esplenócitos totais estimulados com diversos oligonucleótidos. Esplenócitos totais de ratinhos SJL/J naive (1×10^7 células) foram estimulados *in vitro* durante 72 horas na presença do ODN estimulatório (CpG 5 μ g/ml, barras pretas), ODN inibitório (GpG 5 μ g/ml, barras cinzentas) ou sem ODN (nulo, barras brancas). A secreção das citocinas IL12p40, IL12p70, IFN γ , IL-6 e IL-10 foi medida nos sobrenadantes por ensaio ELISA. Os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

Por outro lado, a estimulação isolada com GpG não provocou a secreção de quantidades significativas de qualquer destas citocinas, em relação ao controlo sem presença de ODN. De forma a testar os efeitos da competição de ODN sobre a capacidade de secreção destas moléculas, um ensaio de produção de citocinas foi desenhado com uma concentração constante do ODN estimulador CpG, na presença de concentrações crescentes dos ODN inibitório (GpG) e controlo (CpC). Uma vez mais, observámos que a presença do ODN CpG é suficiente para estimular a secreção de citocinas Th1 como o IFN γ , IL-12 ou IL-6, e também da citocina Th2 IL-10, e que qualquer dos dois outros ODN não possuem qualquer efeito de forma isolada (Figura 40). A junção de quantidades crescentes do ODN

GpG a uma quantidade constante de CpG resulta numa diminuição progressiva, e dose-dependente, da secreção de qualquer destas citocinas, de acordo com o seu papel antagonístico; no que diz respeito ao ODN CpC, o efeito é apenas aparente para a produção de IFN γ e de IL-10, mas não para a IL-12p40 ou IL-6 (Figura 40).

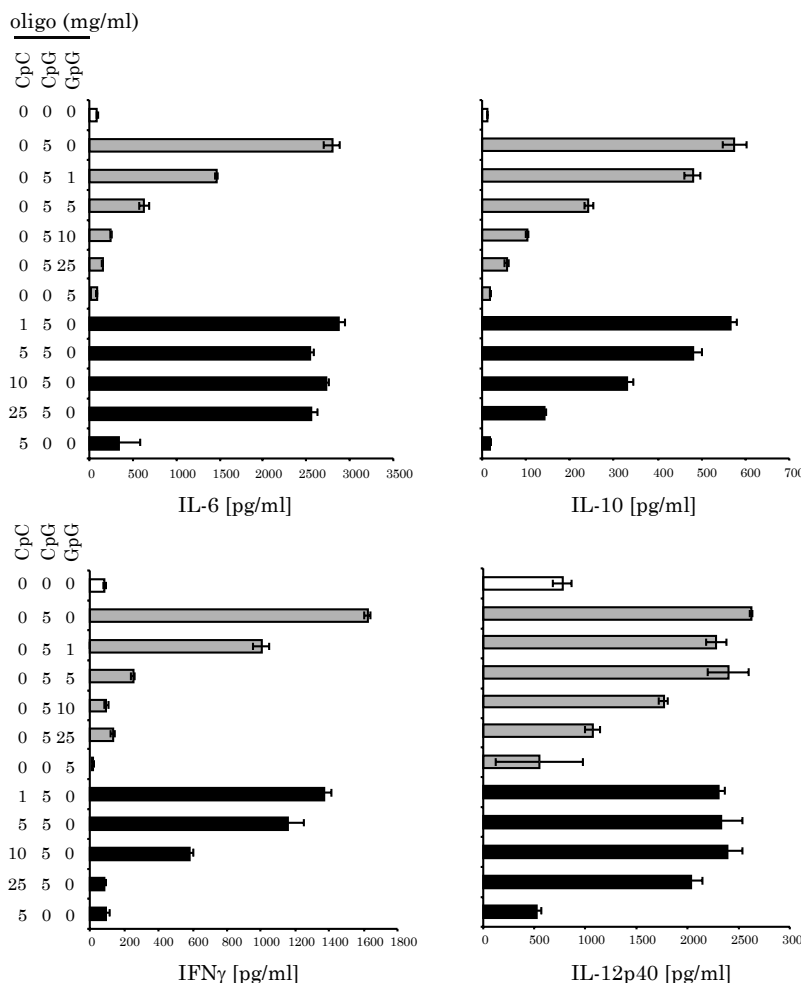


Figura 40. Ensaio de produção de citocinas por esplenócitos totais estimulados com diversos oligonucleótidos. Esplenócitos totais de ratinhos SJL/J naive (1×10^7 células) foram estimulados *in vitro* durante 72 horas na presença de uma concentração constante de ODN CpG (5 μ g/ml) e quantidades crescentes de ODN GpG (barras cinzentas) ou ODN CpC (barras negras). A produção das citocinas IL-12p40, IL-10, IL-6 e IFN γ foi testada no sobrenadante de cultura por método ELISA; os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

Após a demonstração *in vitro* das capacidades de modificação da resposta imune por parte dos ODN CpG e GpG, quer no que diz respeito à expressão de moléculas do MHC classe II e co-estimuladoras por parte das células apresentadoras de antigénio, quer no que diz respeito à capacidade proliferativa e polarização do fenótipo Th, decidimos explorar os potenciais efeitos terapêuticos destes ODN no modelo de EAE. Inicialmente, testámos a capacidade de prevenção do aparecimento dos sinais clínicos de doença no modelo de EAE crónica em ratinhos SJL/J. No mesmo dia da indução tratámos os animais por injeção intraperitoneal de 50 microgramas de cada um dos ODN isoladamente, e igualmente com combinações dos ODN CpG e GpG (50 µg cada) ou CpG e CpC (*idem*). A utilização dos ODNs CpG ou CpC não teve qualquer efeito significativo sobre a evolução da doença, enquanto que a injeção única de GpG teve a capacidade de reduzir significativamente a severidade do curso clínico (Figura 41A), logo desde o início. A combinação de ODN teve resultados diferentes, conforme se tratou da combinação do ODN CpG com GpG ou CpC: enquanto que a combinação com o ODN controlo (CpC) não teve efeitos significativos sobre a gravidade da doença, a presença do ODN GpG, conjuntamente com CpG, levou a uma melhoria parcial do curso clínico, intermédia em relação à utilização do ODN GpG isoladamente. Estes resultados estão de acordo com as interações observadas entre os dois ODN nos estudos *in vitro*. Quando avaliámos a capacidade proliferativa linfocitária no final da experiência, foi possível observar uma redução da proliferação nos grupos de tratamento com GpG e CpC, em comparação com o ODN estimulador CpG; mais ainda, a combinação dos dois ODN CpG e GpG resultou numa supressão muito significativa da proliferação antigénio-específica em relação com todos os grupos de controlo (Figura 41B). No que diz respeito à proliferação não antigénio-específica, na presença do mitogénio concanavalina A, o ODN CpG resultou num aumento substancial, enquanto que nenhum dos outros grupos revelou alterações significativas.

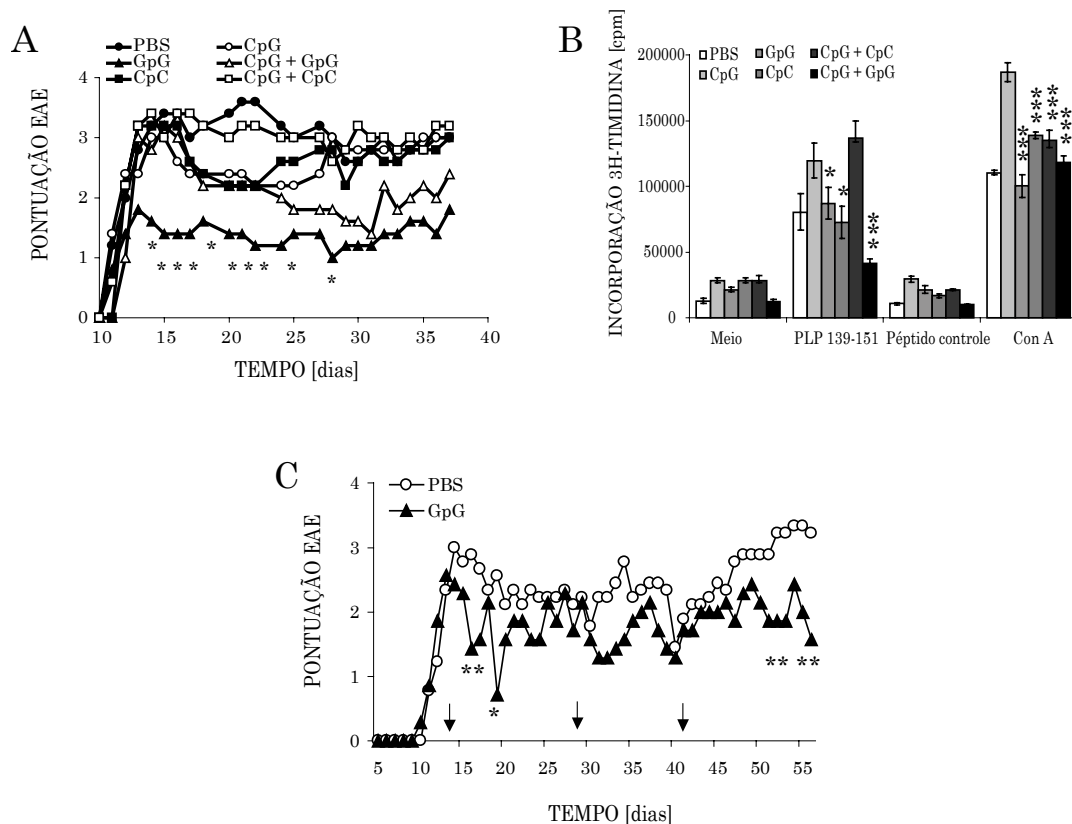


Figura 41. Utilização de ODN imunomoduladores na prevenção e tratamento da EAE em ratinhos SJL/J. A – Prevenção da EAE crónica em ratinhos SJL/J. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com uma emulsão do péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) em ACF; no mesmo dia da indução, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ODN CpG, GpG ou CpC, isoladamente ou em combinação (50 µg de cada ODN/animal/i.p. dissolvido em 200 µl de PBS, n=10 cada grupo), ou PBS intraperitoneal (controle, n=10). O gráfico representa a evolução do curso clínico para cada grupo de tratamento (média ± desvio padrão) até ao final da experiência (representativa de outras duas semelhantes). Os asteriscos representam dias com diferenças estatisticamente significativas entre o grupo GpG e PBS ($p < 0.05$, teste ANOVA). B – No final da experiência anterior (dia 37 pós-imunização), os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias totais estabelecidas e a capacidade de proliferação medida na presença do péptido cognato. O gráfico representa a média ± desvio padrão da proliferação (cpm) de amostras triplicadas. Os asteriscos assinalam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo CpG (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$, teste ANOVA). C – Tratamento da EAE estabelecida com ODN GpG. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com uma emulsão do péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) em ACF; começando no primeiro pico de doença (dia 14 pós-imunização), e a cada 2 semanas depois, o grupo de tratamento recebeu uma injeção intraperitoneal do ODN GpG (50 µg de GpG/animal/i.p. dissolvido em 200 µl de PBS). O gráfico representa a pontuação média de cada grupo de tratamento (n=10). Os asteriscos assinalam os dias com diferenças estatisticamente significativas de severidade clínica em relação ao grupo controle ($p < 0.05$, teste ANOVA).

Tendo em contas estes resultados iniciais na prevenção da EAE antes das suas manifestações clínicas, resolvemos testar a sua eficácia no tratamento de EAE estabelecida, após o primeiro surto da doença. Utilizámos, para tal, o modelo de EAE crónica com surtos em ratinhos

SJL/J, induzido por imunização com o péptido PLP139-151 em ACF. No dia 14 pós-imunização, correspondendo ao primeiro surto clínico, os animais experimentais foram tratados por injeção intraperitoneal de 50 microgramas do ODN GpG, repetida a cada 14 dias. Desta forma, foi possível reduzir a severidade clínica média da doença em vários dias após a injeção em comparação com o grupo de controlo, embora não de forma mantida (Figura 41C). Comparada com os resultados obtidos para a prevenção da doença, a eficácia do ODN GpG, neste regime de administração, parece ser menor. É possível que, com o aumento da dosagem ou da frequência de administração, se consigam melhores resultados no que diz respeito à eficácia terapêutica.

10. Terapêutica de combinação de vacinação com ADN codificador de proteínas de mielina e oligonucleótidos imunomoduladores no tratamento de modelos crónicos de EAE.

Na sequência dos dados apresentados anteriormente sobre o potencial de utilização de sequências oligonucleotídicas modificadas (e.g. GpG) para contrabalançar os efeitos estimuladores dos motivos CpG, presentes inerentemente nas nossas vacinas de ADN, pensámos que a combinação destas duas formas de terapia poderia ter efeitos sinérgicos, e melhorar a eficácia individual de cada uma delas. De facto, enquanto que as vacinas de ADN levariam à supressão e/ou modificação do fenótipo dos clones linfocitários T, através dos mecanismos anteriormente apresentados, os ODN GpG actuariam por interferência com os motivos CpG presentes nas vacinas, e também, potencialmente, pela sua capacidade de estimular preferencialmente a proliferação de células Th2, conforme descrito acima (Figura 38). De forma a testar esta hipótese, fizemos experiências de tratamento em modelos de EAE crónica, tal como, anteriormente, em relação à vacinação com a combinação multigénica *cocktail*, utilizando vacinação com ADN semanal e administração intraperitoneal de ODN quinzenal. No modelo de EAE crónica em ratinhos SJL/J induzido por

imunização com PLP139-151 em ACF, iniciámos o tratamento no pico do primeiro surto clínico; os animais experimentais foram randomizados por vários grupos de tratamento, incluindo um controlo com EAE não tratada, tratamento com GpG isoladamente (dados utilizados na Figura 41), tratamento com *cocktail* e *cocktail*+IL4 sem adição de ODNs (réplicas das experiências realizadas anteriormente descritas nas Figuras 18A, 19A e 29), e *cocktail* ou *cocktail*+IL-4 com adição dos ODN CpG estimulador), GpG (inibidor) e CpC (controlo). A avaliação do curso clínico nesta experiência (Figura 42) mostrou que, de todas as combinações testadas, apenas a utilização do ODN GpG, isoladamente, e a combinação *cocktail*+IL-4+GpG teve eficácia terapêutica (Figura 42A e B). Como se pode observar, a adição de GpG e a vacinação com *cocktail* e IL-4 têm efeitos cumulativos e possivelmente sinérgicos (Figura 42A). Por outro lado, enquanto que o tratamento com GpG consegue, apenas, uma redução parcial da gravidade, e o tratamento com *cocktail* e IL-4 não tem qualquer eficácia, a combinação de ambos teve a maior eficácia terapêutica. Tal como anteriormente, não foi possível observar qualquer efeito sobre a gravidade do curso clínico com a utilização da combinação multigénica *cocktail*, ou da adição do construto IL-4 a esta. No que diz respeito aos grupos que receberam a combinação *cocktail* e IL-4 com os diversos ODNs, apenas no grupo que também recebeu GpG houve uma diferença apreciável de pontuações (Figura 42B). Comparando os grupos tratados com *cocktail* sem IL-4, com e sem qualquer dos ODN administrados, contra o controlo não tratado, não existe aparentemente qualquer efeito benéfico (Figura 42C). Tal como se pode observar da análise estatística dos dados (Figura 43), há uma redução significativa da severidade da doença em vários dias, após o início do tratamento com vacinação de ADN e ODN GpG, em comparação com o grupo de controlo. Curiosamente, no que diz respeito à taxa de surtos para cada grupo, ou ao número de animais sem surtos, o efeito terapêutico desta combinação não é evidente, e, pelo contrário (mas tal como tínhamos reportado anteriormente), a combinação *cocktail* e *cocktail*+IL-4 demonstrou a maior capacidade preventiva.

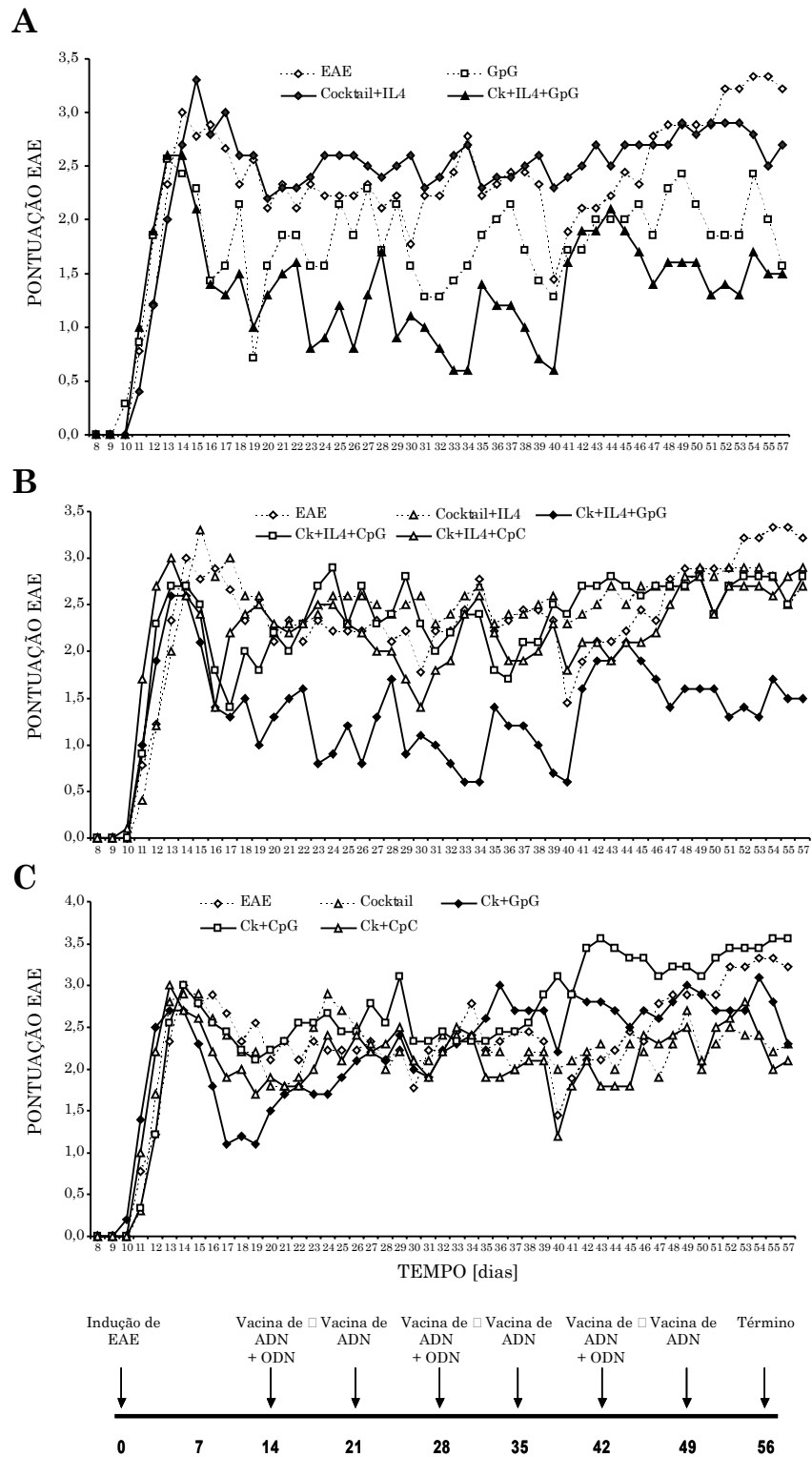


Figura 42. Tratamento da EAE crônica em ratinhos SJL/J por combinação de vacinação com ADN codificador de constructos de mielina e ODN imunomoduladores. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE por imunização com o péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) em ACF; no pico do primeiro surto de doença (dia 14) os animais experimentais foram randomizados em 10 grupos de tratamento (n=10 para todos os grupos): EAE controlo (EAE, sem tratamento), GpG (50 µg/ODN/i.p. cada 14 dias), Cocktail (constructos MBP+MOG+MAG+PLP 25 µg/cada/animal/i.m. semanalmente), Cocktail+IL4 (Cocktail+IL-4, combinação cocktail + constructo IL-4 50 µg/animal/i.m. semanalmente), Cocktail+GpG (Ck+GpG, quantidades idênticas às anteriores), Cocktail+IL-4+GpG (Ck+IL-4+GpG, quantidades idênticas às anteriores), Cocktail+CpG (Ck+CpG, combinação cocktail + 50 µg/ODN CpG/i.p. cada 14 dias), Cocktail+IL-4+CpG (Ck+IL-4+CpG, quantidades idênticas às anteriores), Cocktail+CpC (Ck+CpC, combinação cocktail + 50 µg/ODN CpC/i.p. cada 14 dias) e Cocktail+IL-4+CpC (Ck+IL-4+CpC, quantidades idênticas às anteriores). Os gráficos representam a pontuação média para cada grupo de tratamento ao longo de 56 dias de tratamento. No esquema inferior está assinalado a forma de tratamento para todos os grupos.

Tratamento	n	Incidência %	Pontuação (dia 14)	Pontuação (dia 24)	Pontuação (dia 34)	Pontuação (dia 44)
Não tratados	9	100	3.0±0.4	2.2±0.5	2.8±0.5	2.2±0.5
Cocktail	10	100	2.9±0.3	2.9±0.4	2.4±0.4	2.0±0.4
Ck+CpG	9	100	3.0±0.4	2.7±0.6	2.3±0.6	3.4±0.3
Ck+GpG	10	100	2.7±0.4	1.7±0.4	2.4±0.4	2.7±0.4
Ck+IL-4	10	100	2.7±0.4	2.6±0.5	2.7±0.5	2.5±0.5
Ck+IL-4+CpG	10	100	2.7±0.4	2.9±0.4	2.4±0.5	2.7±0.4
Ck+IL-4+GpG	10	100	2.6±0.2	0.9±0.3**	0.6±0.4**	2.1±0.3

Tratamento	n	Pontuação (dia 54)	Taxa de surtos	Porcentagem sem surtos
Não tratados	9	3.3±0.4	1.3±0.3	12.5
Cocktail	10	2.4±0.3	0.4±0.2*	55.6
Ck+CpG	9	3.4±0.5	1.3±0.2	0
Ck+GpG	10	3.1±0.4	1.3±0.2	0
Ck+IL-4	10	2.8±0.5	0.6±0.3	50.0
Ck+IL-4+CpG	10	2.8±0.4	1.8±0.3	0
Ck+IL-4+GpG	10	1.7±0.2**	1.1±0.2	10.0

Figura 43. Tratamento da EAE crônica em ratinhos SJL/J por combinação de vacinação com ADN codificador de constructos de mielina e ODN imunomoduladores. Ratinhos SJL/J foram induzidos com EAE e no pico do primeiro surto de doença (dia 14) os animais experimentais foram randomizados em 10 grupos de tratamento conforme anteriormente descrito. Nas tabelas acima estão mostradas a taxa de incidência após indução de EAE e as pontuações EAE médias nos dias indicados, bem como a taxa de surtos para cada grupo de tratamento e a percentagem de animais sem surtos. As pontuações marcadas com dois asteriscos significam valores $p < 0.05$ no teste Mann-Whitney Wilcoxon por comparação com o grupo não tratado; um asterisco significa valor $p < 0.05$ no teste t-Student por comparação com o grupo não tratado.

Avaliando a capacidade proliferativa dos linfocitária no final da experiência, constata-se que em nenhum dos grupos tratados houve uma supressão apreciável da proliferação contra o péptido cognato (Figura 44A),

nem extensão da resposta T a outros antígenos de mielina, tais como os péptidos MOG35-55, MOG91-106, MBP85-99, Nogo1-22 ou Nogo45-66 (dados não mostrados). Há, no entanto, uma redução relativa da proliferação quando se compara, por exemplo, os grupos tratados por vacinação com *cocktail* com e sem IL-4, e com os vários ODNs. Dentro destes, é interessante notar a redução da proliferação no grupo *cocktail*+IL-4 e GpG, comparada com os grupos com CpC ou CpG; neste último, aliás, a capacidade proliferativa observada foi a mais elevada de todos os grupos. Olhando para os dados de proliferação de outra forma, através do índice de proliferação (razão entre a proliferação contra o antígeno e o nível basal de incorporação de timidina tritiada no meio de cultura), podemos constatar que não existe supressão proliferativa significativa, e que, pelo contrário, em alguns grupos de tratamento com *cocktail* sem IL-4, bem como no grupo *cocktail*+IL-4 e CpG, existe mesmo um aumento deste índice em comparação com o controlo não tratado (Figura 44B). O que estes dados confirmam, uma vez mais, é que a vacinação com ADN como forma de tratamento não interfere, significativamente, com a capacidade proliferativa, e que a adição de ODNs a esta terapêutica não parece ter efeitos supressores (inclusivamente o contrário, no que diz respeito ao ODN estimulador CpG) pelo que o seu mecanismo de acção deve estar relacionado com modificações funcionais da resposta linfocitária.

A avaliação do fenótipo Th, através do padrão de secreção de citocinas por parte de linfócitos periféricos, foi realizada em linhas celulares T derivadas dos gânglios linfáticos periféricos de todos os grupos de tratamento. Após estimulação com o péptido indutor (PLP139-151), foi possível observar que as LCT dos animais com EAE não tratada manifestam um fenótipo predominantemente Th1, com secreção de elevadas quantidades de IFN γ e IL-6, e menor quantidade de IL-10 ou IL-4 (Figura 45A); a razão Th2/Th1 para estas linhas celulares, como tal, é inferior a 1 quer para a relação IL-10/IFN γ , quer para a relação IL-4/IFN γ (Figura 45C). O tratamento com o ODN GpG isoladamente resulta num aumento da secreção

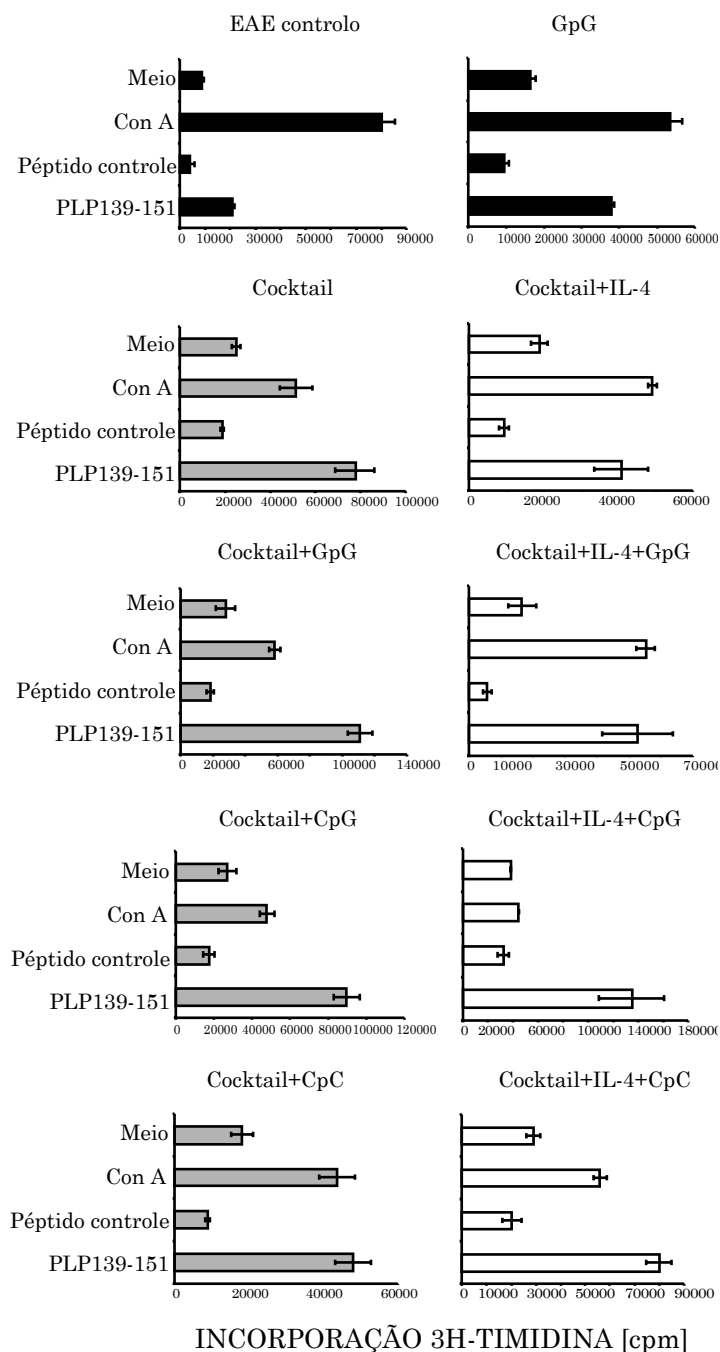


Figura 44A. Ensaio de proliferação de linfócitos periféricos de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por co-administração de vacinas de ADN e ODN imunomoduladores. No final da experiência anterior, os gânglios linfáticos de drenagem de cada grupo de tratamento foram dissecados, culturas linfocitárias totais estabelecidas e a capacidade proliferativa testada contra o péptido cognato (PLP139-151, 20 µg/ml), outros antígenos de mielina (MOG35-55, MOG91-106, MBP85-99, Nogo1-22, Nogo45-66, dados não mostrados), péptido controle (Vβ5.1, 20 µg/ml) e concanavalina A (Con A, 5 µg/ml) (0.5×10^6 células por poço para todas as condições). Os gráficos representam os valores médios de proliferação (cpm) \pm desvio padrão de amostras triplicadas para cada condição. No topo de cada gráfico está indicado o grupo de tratamento.

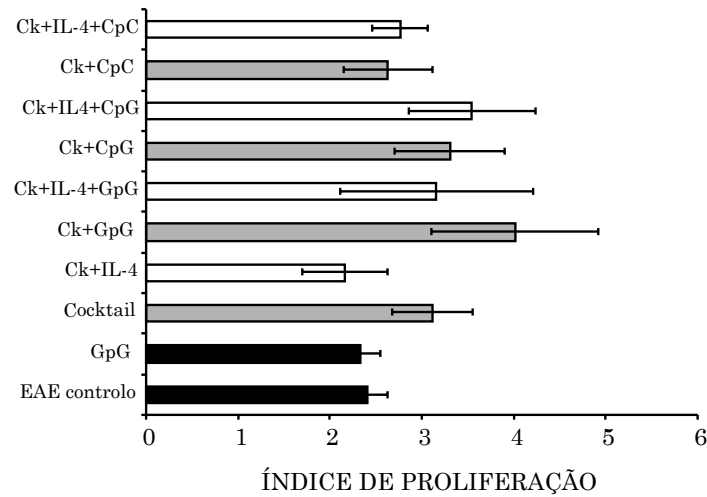


Figura 44B. Índice de proliferação (IP) a partir dos resultados da experiência anterior. O gráfico representa a média \pm desvio padrão da razão entre a proliferação contra o péptido cognato PLP139-151 (20 μ g/ml) e a proliferação sem estimulação antigénica (meio). Os grupos de tratamento encontram-se indicados no eixo das ordenadas, e o IP para cada grupo expresso em unidades arbitrárias no eixo das abcissas.

de IFN γ e numa redução na secreção de IL-10, consistentes com um enviesamento Th1 manifestado também nas razões Th2/Th1 (Figura 45A e C). Todos os grupos de tratamento com *cocktail* sem IL-4, com e sem adição de ODNs, demonstraram igualmente um enviesamento Th1, bem como o tratamento com *cocktail* e IL-4 sem ODN (Figura 45A, B e C). Tínhamos já, anteriormente, encontrado este fenómeno de enviesamento Th1 após tratamento prolongado com *cocktail* e IL-4 em experiências anteriores neste modelo (Figuras 21, 22, 31A e B). Com a adição de ODN ao tratamento combinado com *cocktail* e IL-4, no entanto, assistiu-se a uma modificação do fenótipo Th. O adicionar do ODN GpG resultou num aumento considerável da produção de IL-10 e IL-4, sem mudança significativa da produção de IFN γ , e, consequentemente, num enviesamento Th2 notável (Figura 45A e C). Por sua vez, o ODN CpG levou, sobretudo, a uma pequena redução da secreção de IFN γ , mas sem afectar as citocinas Th2 IL-4 e IL-10 (Figura 45A); dada esta redução, no entanto, as razões Th2/Th1 também aparecem ligeiramente desviadas para Th2 de forma artificial (Figura 45C). No que

diz respeito ao ODN de controlo CpC, observa-se neste caso um real desvio Th1 mediado pelo aumento de produção de IFN γ e uma diminuição da produção de IL-10 (Figura 45A e C). Globalmente, estes resultados não só confirmam o desvio Th1 encontrado anteriormente, nas experiências de tratamento prolongado com vacinas de ADN, mas, também, que é possível modificar esse fenómeno pela co-administração de pequenas sequências oligonucleotídicas, com capacidade de influenciar o desenvolvimento da resposta imune através de mecanismos ligados ao funcionamento do sistema imune inato. Provavelmente, na mesma altura em que a vacina de ADN está a ser transcrita e o antígeno por ela codificado a ser apresentado no contexto de uma molécula de MHC classe II, o estímulo providenciado pelo ODN, através do receptor TLR9 ou através de outros mecanismos ainda não conhecidos, irá condicionar a diferenciação linfocitária subsequente. É possível, com base nos resultados *in vitro* descritos na secção anterior, que o estímulo proliferativo preferencial para linfócitos Th2, providenciado pelas sequências GpG, leve ao seu desenvolvimento preferencial, após a sua génese a partir de linfócitos T naive. A utilização isolada de GpG não produz, provavelmente, o mesmo enviesamento, dada a ausência de outro estímulo – a combinação de vacinas de ADN codificadoras de proteínas de mielina e IL-4 – que leve à geração de clones Th2.

De forma a avaliar de outra forma o impacto terapêutico da administração combinada de vacinas de ADN e ODN imunomoduladores, no final da experiência anterior retirámos o sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) e examinámo-lo para a presença de lesões inflamatórias e desmielinizantes. Em relação ao número de focos inflamatórios presentes no parênquima e meninges do SNC destes animais, observa-se uma redução estatisticamente significativa nos dois locais, com ambos os tratamentos que demonstraram eficácia clínica, i.e. GpG isoladamente e em combinação com *cocktail* e IL-4. Ao contrário, a combinação de vacinação multigénica (*cocktail*+IL-4) e o ODN estimulador CpG levou a um aumento considerável do número de focos inflamatórios (Figura 46A). Utilizando outra técnica

para avaliar o número de lesões desmielinizantes focais (coloração Luxol Fast Blue e Periodic Acid Schiff), constata-se um fenómeno semelhante de redução do número de lesões nos grupos terapeuticamente eficazes, e uma tendência para o aumento com a vacinação de ADN combinada com CpGs (Figura 46B).

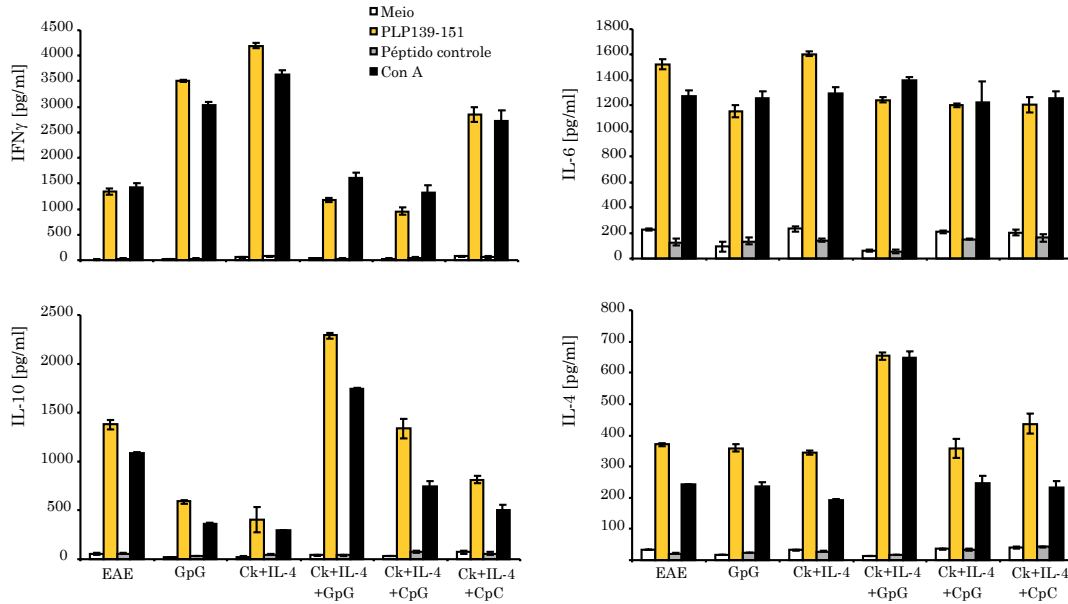


Figura 45A. Ensaio de produção de citocinas a partir de linfócitos periféricos de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por co-administração de vacinas de ADN e ODN imunomoduladores. Linhas celulares T foram estabelecidas a partir de linfócitos totais extraídos de gânglios periféricos dos vários grupos de tratamento, estimuladas *in vitro* durante 2 ciclos de proliferação, e a capacidade de secreção de citocinas testada após estimulação com o seu péptido cognato (PLP139-151, 10 μ g/ml), péptido controle (V β 5.1, 10 μ g/ml) e concanavalina A (Con A, 5 μ g/ml). A presença das citocinas IFN γ , IL-4, IL-6 e IL-10 foi testada nos sobrenadantes por ensaio ELISA. Os gráficos representam a concentração média de citocinas \pm desvio padrão de amostras triplicadas para cada grupo de tratamento.

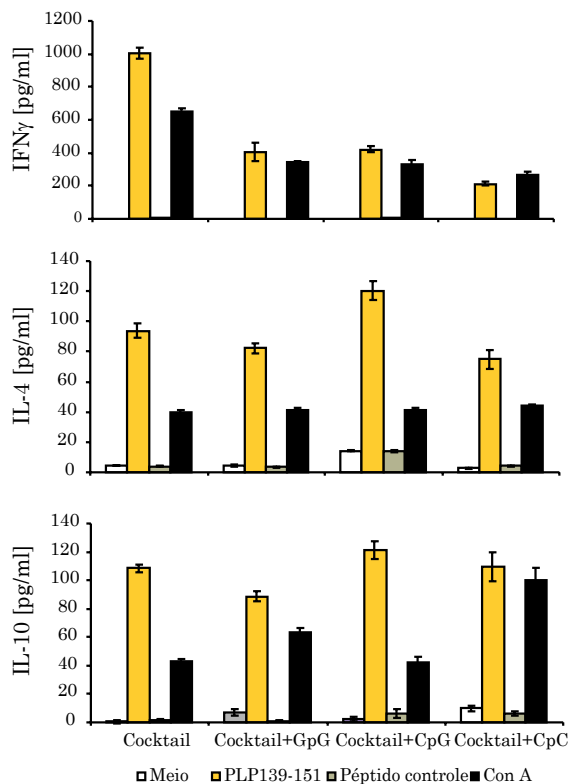


Figura 45B. Ensaio de produção de citocinas a partir de linfócitos periféricos de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por co-administração de vacinas de ADN e ODN imunomoduladores. Linhas celulares T foram estabelecidas a partir de linfócitos totais extraídos de gânglios periféricos dos vários grupos de tratamento, estimuladas *in vitro* durante 2 ciclos de proliferação, e a capacidade de secreção de citocinas testada após estimulação com o seu péptido cognato (PLP139-151, 10 μ g/ml), péptido controle (V β 5.1, 10 μ g/ml) e concanavalina A (Con A, 5 μ g/ml). A presença das citocinas IFN γ , IL-4, IL-6 e IL-10 foi testada nos sobrenadantes por ensaio ELISA. Os gráficos representam a concentração média de citocinas \pm desvio padrão de amostras triplicadas para cada grupo de tratamento.

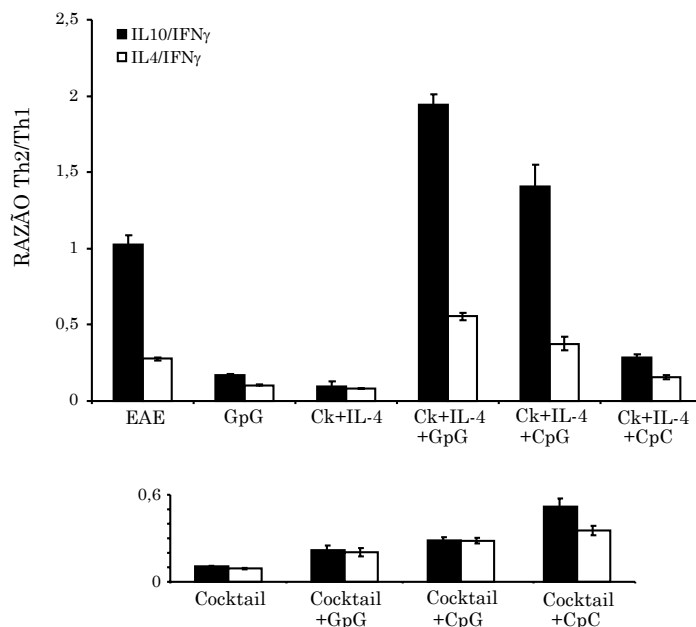


Figura 45C. Ensaio de produção de citocinas a partir de linhas celulares T derivadas de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por co-administração de vacinas de ADN e ODN imunomoduladores. Os gráficos representam a razão Th2/Th1 (concentração de IL-10 ou IL-4 dividida pela concentração de IFN γ) \pm desvio padrão para cada grupo de tratamento, exprimindo o enviesamento do fenótipo *Th_{helper}*.

Estas observações não só confirmam, histologicamente, os efeitos benéficos detectados no que diz respeito ao curso clínico, mas, também, ilustram os efeitos estimuladores do ODN CpG, que apesar de não agravar, significativamente, o curso da doença, aumenta a capacidade proliferativa dos linfócitos T e aumenta também a carga lesional no SNC. Por outro lado, em relação ao uso isolado do ODN GpG, existe uma correlação entre a redução da severidade clínica da doença e o número de focos inflamatórios, mas, neste caso, não ocorre uma mudança fenotípica Th benéfica.

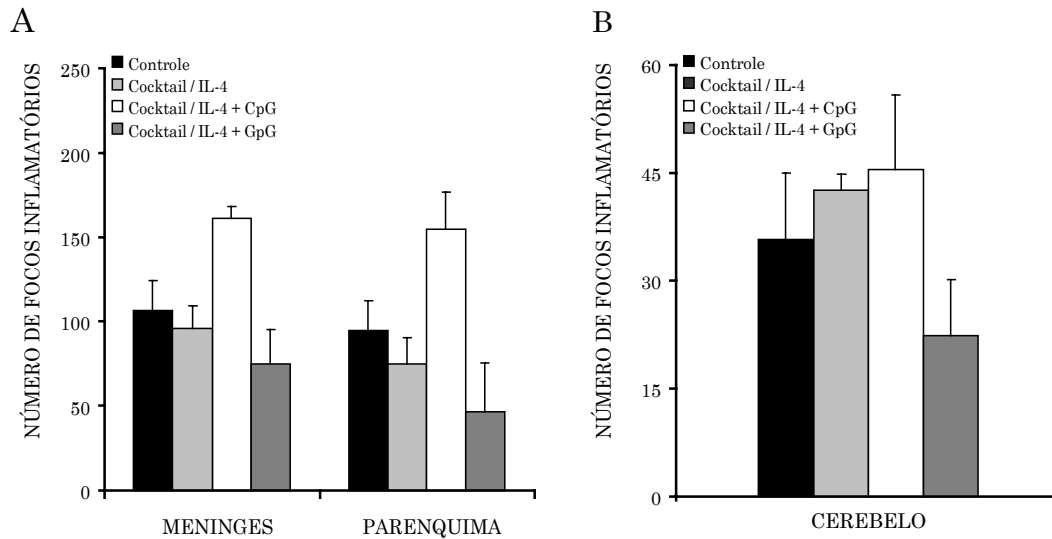


Figura 46. Avaliação histopatológica do número de lesões inflamatórias e desmielinizantes no SNC de ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por co-administração de vacinas de ADN e ODN imunomoduladores. No final da experiência anterior, o SNC de ratinhos representativos de 4 grupos de tratamento (n=3 para cada grupo) foi isolado e o número de focos inflamatórios/desmielinizantes avaliados através de uma técnica semiquantitativa. A – quantificação do número de focos inflamatórios nas meninges e parênquima após coloração por hematoxilina+eosina. B – quantificação do número de lesões desmielinizantes por coloração Luxol Fast Blue. Os gráficos representam a média do número de focos/lesões \pm desvio padrão, para cada um dos grupos de tratamento.

No que diz respeito à resposta linfocitária B, utilizámos, novamente, a tecnologia de *arrays* de mielina descrita anteriormente, e que nos permitiu esclarecer, parcialmente, o mecanismo de acção da vacinação com ADN (Figura 28). Para estas experiências, foi desenvolvida uma modificação à técnica descrita, consistindo na utilização de anticorpos secundários com fluorescências distintas para a detecção de isotipos de imunoglobulinas (IgG1, IgG2a, IgM). Foram, igualmente, adicionados mais antigénios aos

contidos anteriormente nos *arrays*, para um total aproximado de 515 antígenos, incluindo proteínas e conjuntos de péptidos representando alvos importantes na EAE, tais como a proteína básica de mielina (MBP) e Golli-MBP, proteína proteolipídica (PLP), glicoproteína oligodendrocitária da mielina (MOG), proteína básica oligodendrocítica associada à mielina (MBOP), proteína específica oligodendrocítica (OSP), α B-cristalina, fosfodiesterase nucleotídica cíclica (CNPase), e (na sequência de trabalhos que descreveremos no próximo capítulo) péptidos da recentemente identificada proteína Nogo-A. Retirámos amostras de soro, no final da experiência anterior (dia 56), e testámos a presença de anticorpos anti-mielina utilizando os *arrays* descritos. Inicialmente, procurámos identificar diferenças entre a resposta isotípica de imunoglobulinas, através da detecção de reactividades IgG2a (Th1) ou IgG1 (Th2), separadamente e em conjunto, nos diferentes grupos de tratamento. Tal como anteriormente, o maior grau de diversificação intermolecular da resposta auto-reactiva linfocitária B contra antígenos de mielina foi detectado no grupo não tratado (Figura 47A). A reactividade mais elevada foi encontrada contra o péptido imunizador (PLP139-151), com valores de reactividade elevados encontrados, também, contra alguns antígenos da MBP, MOG, Nogo-A, MOBP e MAG; outros alvos antígenicos de menor reactividade incluíram sobretudo outros péptidos da MBP. Saliente-se que esta é a primeira demonstração de que, durante o curso da EAE, a resposta imune (neste caso mediada por anticorpos) exhibe diversificação para antígenos da proteína Nogo-A, particularmente para o antígeno Nogo1-22, associado na estirpe SJL/J a uma resposta Th1 (ver Capítulo V). Como tal, esta proteína poderá ser um novo alvo antígeno, com interesse para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da EAE, e, possivelmente, da EM. Como veremos no próximo Capítulo deste trabalho, tal hipótese veio a ser confirmada pelo menos para o modelo experimental desta doença.

O tratamento com o ODN GpG, isoladamente, levou a uma redução parcial da reactividade anti-mielina, manifestada por uma diminuição dos valores de reactividade para os antígenos principais, e pelo

desaparecimento de alguns antígenos de menor reactividade. Esta redução, no entanto, foi particularmente evidente nos grupos tratados com a combinação multigénica de vacinas de ADN. No grupo *cocktail*+IL-4, e de forma idêntica ao que tínhamos descrito anteriormente, observou-se uma redução acentuada dos valores de reactividade para os antígenos mais relevantes, e o desaparecimento de vários antígenos de menor reactividade. Esta redução da diversificação da resposta linfocitária B foi particularmente dramática com a adição dos ODNs GpG e CpG. Em ambos os casos, mas sobretudo neste último, assistiu-se ao desaparecimento da grande maioria das reactividades secundárias, e a uma redução significativa dos valores para as reactividades principais.

Estes achados estão em aparente contradição com os dados clínicos, histológicos e de produção de citocinas para os grupos de co-administração de vacinas de ADN e ODNs; a combinação *cocktail*+IL-4+GpG resultou na maior eficácia clínica e maior enviesamento Th2, enquanto que a mesma combinação com o ODN CpG não teve eficácia clínica, e levou a um aumento do número de lesões inflamatórias no SNC. De forma a tentar explicar o fenómeno observado, colocámos a hipótese de se poder estar na presença de respostas de anticorpos de diferentes isotipos IgG, relacionados com o tipo de resposta Th e, consequentemente, com significado patológico distinto. Comparando as reactividades IgG2a e IgG1 entre estes dois grupos (Figura 47B), sob a forma de uma razão de reactividades expressa em mapa de agrupamento, podemos observar que em relação aos anticorpos contra o determinante *major* PLP139-151, a maioria das reactividades do grupo tratado com *cocktail*+IL-4 e CpGs são IgG2a, enquanto que o inverso é verdade para o grupo tratado com vacinas de ADN e GpGs, no qual a maioria das respostas são IgG1. Mais ainda, é possível detectar uma série de outras reactividades IgG1 contra outros antígenos secundários. Por último, quando avaliámos a presença de anticorpos IgM contra antígenos de mielina nestes dois grupos de tratamento (Figura 47C), pudemos constatar que no grupo tratado com GpG existem reactividades IgM muito mais elevadas contra o antígeno primário PLP139-151, e também contra alguns

antígenos secundários (e.g. MBP87-99, MOG35-55, CNPase356-388), em comparação com o grupo tratado com vacinação de ADN e CpGs.

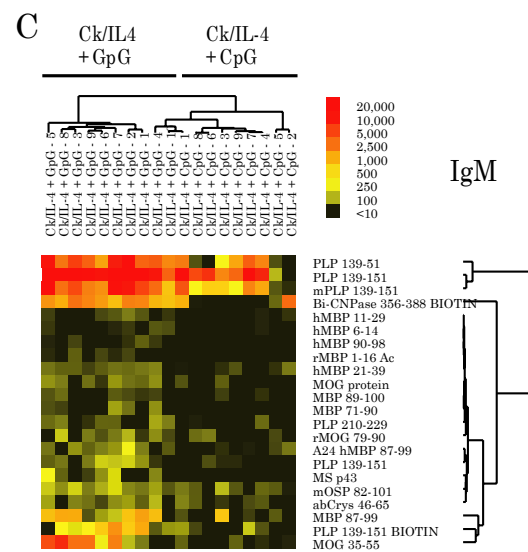
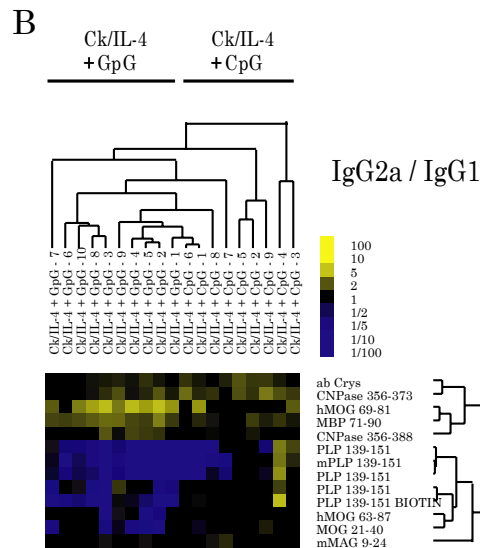
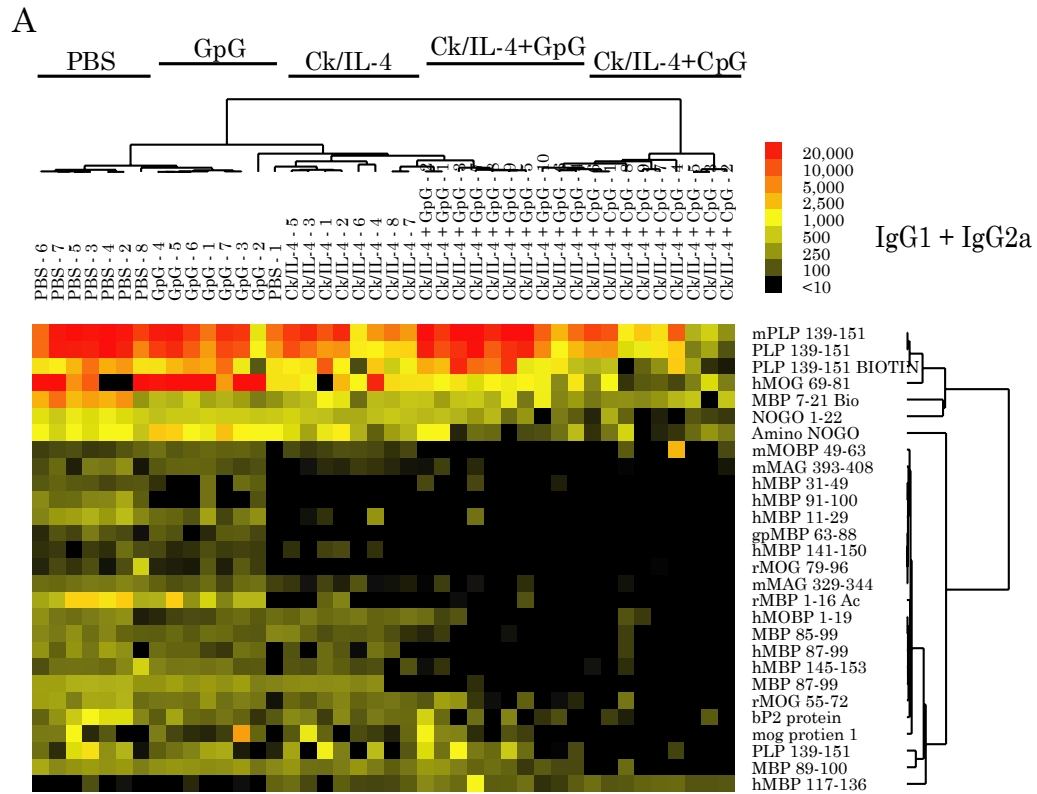


Figura 47. Avaliação da resposta linfocitária B auto-reactiva contra antígenos de mielina em ratinhos SJL/J induzidos com EAE e tratados por co-administração de vacinas de ADN e ODN imunomoduladores. No término da experiência, a presença de anticorpos no soro de animais individuais foi avaliada através de *arrays* de mielina, conforme descrito anteriormente. A – Análise multiclasse SAM da reactividade total de anticorpos IgG1+IgG2a entre quatro grupos de tratamento (controlo PBS, cocktail+IL-4, cocktail+IL-4+GpG e cocktail+IL-4+CpG). B – Análise SAM de duas classes das razões entre as reactividades IgG2a (amarelo) e IgG1 (azul) de amostras dos grupos de tratamento com cocktail+IL-4 e GpG ou CpG. C – Análise SAM de duas classes da reactividade total IgM anti-mielina de amostras dos grupos de tratamento com cocktail+IL-4 e GpG ou CpG. Detectou-se consistentemente reactividade contra o antígeno imunizador, e contra vários outros péptidos de mielina, incluindo péptidos derivados da MBP, MOG, MAG, MOBP, α B-cristalina e Nogo-A. Cada coluna representa os resultados de um animal individual, e cada fila a reactividade fluorescente contra um antígeno de mielina, baseada na escala de cor mostrada. Só se encontram representados antígenos com diferenças estatisticamente significativas identificadas por SAM. Os prefixos denotam a espécie de onde o antígeno foi retirado (h-humano, r-rato, m-ratinho).

Estes dados parecem indicar que, mesmo existindo um grau semelhante de redução da diversificação da resposta linfocitária B nestes dois grupos, há diferenças no que diz respeito ao tipo de anticorpos produzidos, e que podem ter relação com os diferentes cursos clínicos encontrados. A redução da resposta IgG2a e o aumento da resposta IgM no grupo *cocktail*+IL-4+GpG parece significar não só um desvio Th2 – possivelmente associado a uma resposta Th mais benéfica – mas também alguma imaturidade da resposta B neste grupo, eventualmente causada por interferência na cooperação T-B mediada pela vacinação com ADN ou pelos ODNs. No seu papel de células apresentadoras de antígeno, os linfócitos B poderiam ser afectados por qualquer uma destas terapêuticas, com consequências sobre o desenvolvimento da resposta imune.

Depois da demonstração da eficácia terapêutica da combinação de vacinação ADN multigénica com ODN GpG no modelo de EAE crónica com surtos, decidimos avaliar também a sua eficácia no modelo de EAE crónica progressiva em ratinhos C57BL/6. Para tal, induzimos EAE em ratinhos desta estirpe, conforme o protocolo normal, e 23 dias depois da indução (altura do pico inicial da doença), os animais foram randomizados e tratados com combinações de vacinação multigénica/*cocktail* com o constructo IL-4, ao qual foram adicionados os ODNs CpG e GpG. Neste modelo, dada a sua severidade clínica e a evidência das experiências anteriores de que a dosagem de GpG talvez devesse ser aumentada, decidimos utilizar um

esquema terapêutico de administração semanal de vacinas de ADN intramusculares e ODNs intraperitoneais, em vez de administrar ODNs apenas quinzenalmente. Como se pode constatar da avaliação do curso clínico (Figura 48A e B), a administração de vector vazio, ou da combinação multigénica/*cocktail* com o constructo IL-4, não teve qualquer eficácia terapêutica em comparação com o controlo não tratado. Por sua vez, a adição do ODN CpG à vacinação com ADN também não demonstrou efeitos significativos. Quando adicionámos o ODN GpG, no entanto, houve uma melhoria clínica estatisticamente significativa, manifestada, inicialmente, de forma transitória, mas que, a partir do dia 39 pós indução (depois da terceira dose de ADN e ODN), se tornou constante durante mais de 50 dias, e até ao final da experiência (cerca de 3 meses depois da indução de doença) (Figura 48D e 49). Estes dados confirmam que a vacinação com ADN é eficaz no tratamento de formas de EAE crónicas, sobretudo quando adicionada ao ODN inibitório GpG. Comparando estes dados com os obtidos para as experiências de prevenção (Figura 34), confirma-se, uma vez mais, a ineficácia relativa da combinação multigénica/*cocktail* com IL-4 isolada neste modelo, quando comparada, por exemplo, com a combinação MOG+IL-4 para prevenção ou tratamento. Infelizmente, não temos dados sobre o tratamento crónico da EAE com apenas MOG+IL-4, que nos permitam tirar conclusões sobre a manutenção da sua eficácia a longo termo. Aparentemente, no entanto, a administração crónica de vacinas de ADN para tratamento exige, também no modelo de EAE em ratinhos C57BL/6, a co-administração de sequências GpG de forma a manter a eficácia terapêutica, pelo menos quando a carga de ADN a administrar é elevada.

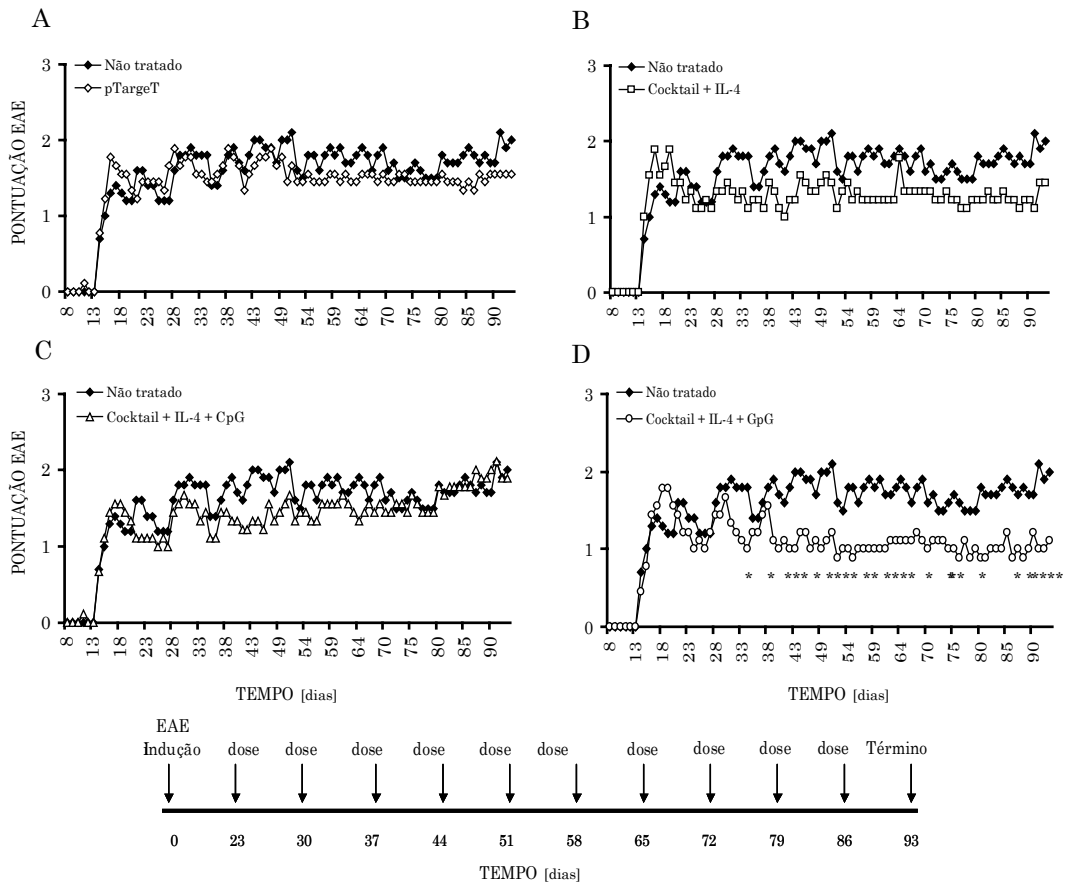


Figura 48. Tratamento da EAE crônica em ratinhos C57BL/6 por combinação de vacinação com ADN codificador de constructos de mielina e ODN imunomoduladores. Ratinhos C57BL/6 foram induzidos com EAE por imunização com o péptido MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) em ACF e PTX (400 ng/animal/e.v. em duas doses separadas de 48 horas). No pico da doença aguda (dia 23), os animais experimentais foram randomizados em 5 grupos de tratamento (n=10 para todos os grupos): EAE controlo (não tratado), cocktail+IL-4 (constructos MBP+MOG+MAG+PLP 25 µg/cada/animal/i.m. semanalmente + constructo IL-4, 50 µg/animal/i.m. semanalmente), Cocktail+IL-4+CpG (combinação cocktail + CpG 50 µg/animal/i.p. semanalmente) e cocktail+IL-4+GpG CpG (combinação cocktail + GpG 50 µg/animal/i.p. semanalmente). Os gráficos (A-D) representam a pontuação média para cada grupo de tratamento ao longo da experiência em comparação com o controlo EAE não tratado. Os asteriscos no gráfico D assinalam os dias com diferenças de pontuação estatisticamente significativas ($p < 0.05$, teste Mann-Whitney). No esquema inferior está assinalado a forma de tratamento para todos os grupos.

Tratamento	n	Incidência %	Pontuação (dia 23)	Pontuação (dia 33)	Pontuação (dia 43)	Pontuação (dia 53)
Não tratados	10	100	1.4±0.3	1.8±0.3	2.0±0.3	1.5±0.3
pTargeT	9	100	1.4±0.2	1.6±0.3	1.7±0.3	1.4±0.3
Ck+IL-4	9	100	1.3±0.2	1.3±0.2	1.2±0.1	1.3±0.1
Ck+IL-4+CpG	9	100	1.1±0.1	1.3±0.2	1.3±0.2	1.4±0.4
Ck+IL-4+GpG	9	100	1.2±0.4	1.1±0.1*	1.0±0.2*	1.0±0.2*

Tratamento	n	Pontuação (dia 63)	Pontuação (dia 73)	Pontuação (dia 83)	Pontuação (dia 93)
Não tratados	10	1.8±0.3	1.5±0.3	1.7±0.4	2.4±0.4
pTargeT	9	1.4±0.3	1.6±0.3	1.4±0.3	1.6±0.3
Ck+IL-4	9	1.2±0.2	1.2±0.1	1.2±0.1	1.4±0.2
Ck+IL-4+CpG	9	1.4±0.3	1.6±0.4	1.8±0.5	1.9±0.6
Ck+IL-4+GpG	9	1.1±0.1*	1.1±0.2	1.0±0.2*	1.1±0.2*

Figura 49. Tratamento da EAE crônica em ratinhos C57BL/6 por combinação de vacinação com ADN codificador de constructos de mielina e ODN imunomoduladores. Ratinhos C57BL/6 foram induzidos com e tratados como anteriormente descrito. Nas tabelas acima estão representadas a taxa de incidência após indução de EAE e as pontuações EAE médias nos dias indicados. As pontuações marcadas com asterisco significam valores $p < 0.05$ no teste Mann-Whitney Wilcoxon por comparação com o grupo não tratado.

11. Bibliografia.

1. Acha-Orbea, H., D.J. Mitchell, L. Timmermann, D.C. Wraith, G.S. Tausch, M.K. Waldor, S.S. Zamvil, H.O. McDevitt, and L. Steinman. 1988. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 54:263-273.
2. Urban, J.L., V. Kumar, D.H. Kono, C. Gomez, S.J. Horvath, J. Clayton, D.G. Ando, E.E. Sercarz, and L. Hood. 1988. Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. *Cell* 54:577-592.
3. Vandenbark, A.A., G. Hashim, and H. Offner. 1989. Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* 341:541-544.
4. Howell, M.D., S.T. Winters, T. Olee, H.C. Powell, D.J. Carlo, and S.W. Brostoff. 1989. Vaccination against experimental allergic encephalomyelitis with T cell receptor peptides. *Science* 246:668-670.
5. Waisman, A., P.J. Ruiz, D.L. Hirschberg, A. Gelman, J.R. Oksenberg, S. Brocke, F. Mor, I.R. Cohen, and L. Steinman. 1996. Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity. *Nat Med* 2:899-905.
6. Lobell, A., R. Weissert, M.K. Storch, C. Svanholm, K.L. de Graaf, H. Lassmann, R. Andersson, T. Olsson, and H. Wigzell. 1998. Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 187:1543-1548.
7. Clayton, J.P., G.M. Gammon, D.G. Ando, D.H. Kono, L. Hood, and E.E. Sercarz. 1989. Peptide-specific prevention of experimental allergic encephalomyelitis. Neonatal tolerance induced to the dominant T cell determinant of myelin basic protein. *J Exp Med* 169:1681-1691.
8. Kennedy, M.K., L.J. Tan, M.C. Dal Canto, V.K. Tuohy, Z.J. Lu, J.L. Trotter, and S.D. Miller. 1990. Inhibition of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by immune tolerance to proteolipid protein and its encephalitogenic peptides. *J Immunol* 144:909-915.

9. Khoury, S.J., W.W. Hancock, and H.L. Weiner. 1992. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 176:1355-1364.
10. Ruiz, P.J., H. Garren, I.U. Ruiz, D.L. Hirschberg, L.V. Nguyen, M.V. Karpuz, M.T. Cooper, D.J. Mitchell, C.G. Fathman, and L. Steinman. 1999. Suppressive immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: modulation of T cell costimulation. *J Immunol* 162:3336-3341.
11. Lobell, A., R. Weissert, S. Eltayeb, C. Svanholm, T. Olsson, and H. Wigzell. 1999. Presence of CpG DNA and the local cytokine milieu determine the efficacy of suppressive DNA vaccination in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 163:4754-4762.
12. Garren, H., P.J. Ruiz, T.A. Watkins, P. Fontoura, L.T. Nguyen, E.R. Estline, D.L. Hirschberg, and L. Steinman. 2001. Combination of gene delivery and DNA vaccination to protect from and reverse Th1 autoimmune disease via deviation to the Th2 pathway. *Immunity* 15:15-22.
13. Paul, W.E. 1997. Interleukin 4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation. *Ciba Found Symp* 204:208-216; discussion 216-209.
14. Quelle, F.W., K. Shimoda, W. Thierfelder, C. Fischer, A. Kim, S.M. Ruben, J.L. Cleveland, J.H. Pierce, A.D. Keegan, K. Nelms, and et al. 1995. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol Cell Biol* 15:3336-3343.
15. Takeda, K., T. Tanaka, W. Shi, M. Matsumoto, M. Minami, S. Kashiwamura, K. Nakanishi, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-630.
16. Yoshizawa, I., R. Bronson, A. Ben-Nun, J.R. Richert, M.E. Dorf, and S. Abromson-Leeman. 1998. Differential recognition of MBP epitopes in BALB/c mice determines the site of inflammatory disease induction. *J Neuroimmunol* 89:73-82.
17. Lehmann, P.V., T. Forsthuber, A. Miller, and E.E. Sercarz. 1992. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358:155-157.
18. Vanderlugt, C.J., and S.D. Miller. 1996. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 8:831-836.
19. Yu, M., J.M. Johnson, and V.K. Tuohy. 1996. A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* 183:1777-1788.
20. McMahon, E.J., S.L. Bailey, C.V. Castenada, H. Waldner, and S.D. Miller. 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:335-339.
21. Vanderlugt, C.L., K.L. Neville, K.M. Nikcevic, T.N. Eagar, J.A. Bluestone, and S.D. Miller. 2000. Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164:670-678.
22. Tuohy, V.K., M. Yu, L. Yin, J.A. Kawczak, J.M. Johnson, P.M. Mathisen, B. Weinstock-Guttman, and R.P. Kinkel. 1998. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 164:93-100.
23. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
24. Krieg, A.M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709-760.
25. Janssens, S., and R. Beyaert. 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 16:637-646.
26. Robinson, W.H., C. DiGennaro, W. Hueber, B.B. Haab, M. Kamachi, E.J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M.C. Genovese, H.E. de Vegvar, K. Skriner, D.L. Hirschberg, R.I. Morris, S. Muller, G.J. Pruijn, W.J. van Venrooij, J.S. Smolen, P.O. Brown, L. Steinman, and P.J. Utz. 2002. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8:295-301.
27. Robinson, W.H., H. Garren, P.J. Utz, and L. Steinman. 2002. Millennium Award. Proteomics for the development of DNA tolerizing vaccines to treat autoimmune disease. *Clin Immunol* 103:7-12.
28. Robinson, W.H., P. Fontoura, B.J. Lee, H.E. de Vegvar, J. Tom, R. Pedotti, C.D. DiGennaro, D.J. Mitchell, D. Fong, P.P. Ho, P.J. Ruiz, E. Maverakis, D.B. Stevens, C.C. Bernard, R. Martin, V.K. Kuchroo, J.M. van Noort, C.P. Genain, S. Amor, T. Olsson, P.J. Utz, H. Garren, and L. Steinman. 2003. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nat Biotechnol* 21:1033-1039.

29. Campagnoni, A.T., T.M. Pribyl, C.W. Campagnoni, K. Kampf, S. Amur-Umarjee, C.F. Landry, V.W. Handley, S.L. Newman, B. Garbay, and K. Kitamura. 1993. Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain. *J Biol Chem* 268:4930-4938.
30. Boccaccio, G.L., F. Mor, and L. Steinman. 1999. Non-coding plasmid DNA induces IFN-gamma in vivo and suppresses autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol* 11:289-296.
31. Maloy, K.J., I. Erdmann, V. Basch, S. Sierro, T.A. Kramps, R.M. Zinkernagel, S. Oehen, and T.M. Kundig. 2001. Intralymphatic immunization enhances DNA vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3299-3303.
32. Lucchinetti, C.F., W. Bruck, M. Rodriguez, and H. Lassmann. 1996. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6:259-274.
33. Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, and H. Lassmann. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717.
34. Lassmann, H., W. Bruck, and C. Lucchinetti. 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7:115-121.
35. Freund, J., and K.J. Thompson. 1945. A simple, rapid technic of preparing water-in-oil emulsions of penicillin, drugs and biologicals. *Science* 101:468-469.
36. Krieg, A.M., A.K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G.A. Koretzky, and D.M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
37. Sun, S., H. Kishimoto, and J. Sprent. 1998. DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. *J Exp Med* 187:1145-1150.
38. Sparwasser, T., E.S. Koch, R.M. Vabulas, K. Heeg, G.B. Lipford, J.W. Ellwart, and H. Wagner. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28:2045-2054.
39. Davis, H.L., R. Weeratna, T.J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr, and A.M. Krieg. 1998. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160:870-876.
40. Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9305-9310.
41. Segal, B.M., J.T. Chang, and E.M. Shevach. 2000. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol* 164:5683-5688.

≈ CAPÍTULO V

Identificação da Proteína Inibidora do Recrescimento Axonal, Nogo-A, Como Autoantigénio no Modelo de Encefalomyelitis Autoimmune Experimental.

1. Introdução e antecedentes. Objectivos e plano experimental.

Tal como foi referido na introdução a este trabalho, a presença de inibidores do recrescimento axonal na mielina do Sistema Nervoso Central tem sido reconhecida como um dos factores responsáveis pela incapacidade de recuperação das lesões neste órgão. A sua existência foi intuída, quase desde a criação da teoria neuronal, por RAMON Y CAJAL. Este autor postulou a existência de algum componente da substância branca do Sistema Nervoso Central que pudesse impedir a regeneração axonal, após a ocorrência de qualquer tipo de agressão a este órgão (revisto em (1)). Como discutiremos em maior pormenor no Capítulo VII, só no início dos anos 80 do século XX, no entanto, foi a presença destes componentes confirmada, e esta capacidade inibitória atribuída a fracções da mielina do SNC (2). Mais recentemente, sobretudo pelos trabalhos de dois grupos de investigadores, liderados por Marie FILBIN e Martin SCHWAB, a atenção tem-se concentrado na identificação concreta dos componentes da mielina responsáveis pela acção inibitória. Este esforço, que se prolongou ao longo das duas últimas décadas, culminou na identificação do papel fundamental da glicoproteína associada à mielina – MAG – (por FILBIN e seu grupo), e de uma nova proteína da mielina, cuja identidade só foi, concretamente, definida em 2000, por três grupos em simultâneo, e denominada Nogo-A (revisto em (3)). A especificidade da expressão desta proteína para a mielina do SNC, em comparação com a MAG, criou, naturalmente, grandes expectativas de que se poderia estar na presença do principal responsável pela inibição da regeneração axonal após danos no SNC, e, como tal, um enorme esforço de investigação tem sido concentrado no estudo desta proteína, seus mecanismos de acção, e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas destinadas a bloquear os seus efeitos inibitórios (revisto em (4)). A regeneração pós-trauma do SNC, e principalmente pós-trauma medular, tem sido a principal área de investigação dentro da patologia nervosa interessada no aprofundar do conhecimento sobre os inibidores da regeneração axonal, e em particular sobre a proteína Nogo-A. A maioria dos

trabalhos publicados sobre esta proteína nos últimos 6 anos referem-se, portanto, a este campo, e as estratégias terapêuticas desenvolvidas tem sido aplicadas, sobretudo, a modelos de trauma medular e de compressão do nervo óptico. No que diz respeito às doenças desmielinizantes, e em particular à Esclerose Múltipla e seu modelo experimental, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), é natural o interesse que a proteína Nogo-A desperta. Em primeiro lugar, dada a relevância que a destruição axonal tem assumido, recentemente, no campo das doenças desmielinizantes. Embora a presença de patologia axonal seja referida desde o início da história da Esclerose Múltipla por CHARCOT, a sua importância foi negligenciada ao longo de muitos anos, e só com os trabalhos recentes de TRAPP e LASSMAN, tem sido reconhecida a sua existência. Mais do que isso, a perda axonal difusa tem sido equiparada à progressão da incapacidade, e identificada como substrato das alterações neurológicas não relacionáveis com surtos localizados, tal como a deterioração cognitiva (5-7). Como tal, a possibilidade de melhorar a regeneração axonal, após lesões desmielinizantes de causa imune, poderia assumir um papel terapêutico importante, quer levando a uma melhor recuperação depois de um surto desmielinizante, quer impedindo a progressão da incapacidade. Em segundo lugar porque, sendo esta uma nova proteína da mielina, o seu papel como alvo potencial da resposta imune no contexto quer da EAE, quer da Esclerose Múltipla merece ser investigado e esclarecido.

Vários alvos antigénicos foram já identificados no conjunto das proteínas da mielina do SNC, entre as quais a MBP, MOG, PLP e outros componentes *minor* (revisto nos Capítulos I, II e em (8)). O papel que a resposta imune contra qualquer um destes componentes assume é, naturalmente, alvo de grande interesse, e têm sido acumulados dados ao longo dos anos para justificar a importância de cada um destes antígenos. Na EM não existe, ao contrário dos modelos de EAE, nenhum antígeno imunodominante, nem tal seria de esperar dada a heterogeneidade das moléculas de apresentação de antígeno existentes na população humana; alguns epítomos, no entanto, para qualquer destas proteínas, têm sido

identificados como sendo de maior importância, tal como o péptido MBP83-99 (revisto em (8)). A identificação de um novo alvo antigénico potencial, como a proteína Nogo-A, merece, portanto, que seja estudada a resposta imune contra ela, inicialmente em modelos animais e, depois, em doentes com patologia desmielinizante.

Por outro lado, uma das estratégias terapêuticas, utilizadas na tentativa de melhorar a regeneração axonal pós-trauma, tem sido a de induzir uma reacção imune contra a proteína Nogo, ou, mais propriamente, contra os seus domínios inibitórios identificados *i.e.* Nogo-66 e Nogo N-terminal. Existem ainda escassos estudos publicados nesta área, e pouco é conhecido da resposta imune gerada após imunização com péptidos provenientes desta proteína. A manipulação terapêutica da resposta imune contra componentes da mielina tem sido utilizada como forma de potenciar a regeneração pós-trauma, em modelos de trauma medular e compressão do nervo óptico. A maioria dos trabalhos publicados provém do laboratório de Michal SCHWARTZ, e têm sido desenvolvidos na premissa de que a resposta imune, no contexto de lesões traumáticas ou degenerativas do SNC, pode assumir papéis benéficos, um paradigma denominado pelos próprios de autoimunidade neuroprotectora (revisto em (9, 10)). Num trabalho publicado recentemente, estes autores induziram uma resposta imune contra o epítipo Nogo623-640 da proteína Nogo-A através de imunização activa com o péptido respectivo emulsificado em ACF e observaram uma melhor resposta recuperativa pós-trauma medular, mediada à custa de uma resposta linfocitária T, não tendo sido observada nenhuma produção de anticorpos (11). Outros autores tentaram induzir anticorpos contra componentes da mielina por vacinação quer com homogeneizado de medula espinhal (12), quer com uma proteína de fusão da sequência Nogo174-979 com o fragmento C-terminal da toxina tetânica (13), quer com uma combinação de MAG e da sequência Nogo-66 em adjuvante incompleto de FREUND, ou hidróxido de alumínio (14) (revisto no Capítulo VII e em (3)). Em qualquer destes casos, não foram observados sinais de activação imune deletéria que pudesse causar desmielinização no SNC, apesar de terem sido usadas espécies

animais susceptíveis à EAE. No entanto, na maioria destas experiências o protocolo de imunização foi desenhado especificamente para evitar a geração de respostas imunes deletérias, quer pela administração de adjuvantes não-encefalitogénicos, quer pelo enviesamento propositado da resposta imune para o braço humoral, que, isoladamente, não é suficiente para induzir desmielinização autoimune.

Por último, os nossos próprios dados sobre a dinâmica da resposta humoral durante o curso da EAE (anteriormente mencionados) confirmaram a importância potencial da Nogo-A. De facto, foi possível detectar, no contexto da diversificação de epítomos da resposta humoral, anticorpos anti-Nogo1-22 (uma sequência peptídica proveniente da ansa Nogo-66), em ratinhos SJL/J com EAE crónica induzida após imunização com PLP139-151, o seu antígeno imunodominante (ver Capítulo IV, Figura 47).

Tendo em conta estes dados preliminares, propusemo-nos estudar a) o papel desempenhado pela proteína Nogo-A na regeneração axonal, dentro do contexto de doenças desmielinizantes como a EAE; b) a resposta imune contra a proteína Nogo-A, com a finalidade eventual de desenvolver formas de terapêutica antígeno-específicas baseadas em epítomos desta proteína, tal como vacinas de ADN ou ligandos peptídeos alterados, mas também c) com o intuito de averiguar o seu papel potencial como autoantígeno em modelos experimentais de desmielinização. Em nosso entender, a questão da encefalitogenicidade dos péptidos Nogo deve ser respondida de forma inequívoca antes que se possa pensar em utilizar estratégias de imunização contra esta proteína, no tratamento de patologias do SNC. Como exemplo da importância desta precaução, citamos o caso recente da vacinação terapêutica contra a proteína beta amiloide em doentes com doença de ALZHEIMER; inicialmente, os estudos animais provaram a eficácia desta vacinação na remoção de beta amiloide do cérebro de ratinhos transgénicos para a proteína precursora do amiloide (APP) humana, com mutações que levam, espontaneamente, ao desenvolvimento de um quadro neuropatológico e comportamental semelhante à doença de ALZHEIMER. Quando a vacinação com beta amiloide passou à fase de experimentação humana, os

ensaios clínicos tiveram que ser interrompidos, precocemente, pelo aparecimento de sinais clínicos, imagiológicos e neuropatológicos consistentes com uma encefalite pós-imunização, provocada por uma reacção imune descontrolada. Foi demonstrado, *a posteriori*, que era possível induzir desmielinização autoimune com base em imunização com o péptido beta amiloide em estirpes de ratinho susceptíveis a EAE (15). De forma a responder às questões colocadas, desenvolvemos estudos em modelos de EAE induzida em ratinhos *knockout* para a proteína Nogo-A/B/C (trabalho em colaboração com o laboratório de Marc TESSIER-LAVIGNE) para avaliação da importância desta proteína na regeneração pós-desmielinização e no prognóstico a longo termo. Para averiguar o potencial encefalitogénico da proteína Nogo-A, e, designadamente, das suas regiões com funções inibitórias, tentámos induzir respostas linfocitárias T e B em estirpes de ratinhos normalmente utilizadas em estudos de doença autoimune, e, sobretudo, naquelas susceptíveis à EAE. Para tal, usámos estratégias de imunização destinadas a quebrar tolerância contra epítomos *minor* de mielina, baseadas na administração de péptidos emulsificados em adjuvante completo de FREUND (ACF) conjuntamente com toxina de *Bordetella pertussis*. Estudámos a resposta linfocitária T utilizando várias técnicas diferentes, incluindo ensaios de proliferação e de produção de citocinas, criação e transferência adoptiva de linhas celulares, caracterização do repertório do receptor da célula T, e avaliação de marcadores de activação e memória. A resposta linfocitária B foi estudada através de quantificação de resposta de anticorpos, e, sobretudo, utilizando a tecnologia de *spotted arrays* desenvolvida, no nosso laboratório, para análise *multiplex* da presença de anticorpos.

2. Estudos em modelos *knockout* para a proteína Nogo.

De forma a podermos estudar o contributo da proteína Nogo-A para a regeneração axonal no modelo de EAE, resolvemos induzir doença em ratinhos *knockout* para esta proteína. Para tal, obtivemos^f duas estirpes mutantes Nogo-A/B/C num *background* HLA H-2^b ((C57BL/6 x 129S7)NE2) conforme descritas recentemente na literatura. A estirpe mutante NC foi gerada por mutação dirigida ao *terminus* C comum a todas as isoformas Nogo e que contém a região Nogo-66. Demonstrou-se, anteriormente, que este mutante é nulo ou hipomorfo grave para Nogo-A e B, e nulo para Nogo-C (16). A estirpe NN foi gerada por processos idênticos, mas mantendo a expressão de Nogo-C, e eliminando, apenas, a expressão de Nogo-A e B.

Nos estudos iniciais com a estirpe NC, foi induzida EAE utilizando um protocolo baseado na imunização com o péptido MOG35-55 e administração de *pertussis*. O seguimento clínico destes animais durante as 6 semanas seguintes revelou que a ausência de proteína Nogo se traduzia numa menor gravidade clínica da EAE, em comparação com controlos de *background* genético semelhante, ou ratinhos C57BL/6 normais (Figura 1A). Esta diferença não era estatisticamente significativa no final da experiência (Mann-Whitney $p=0.043$ no dia 33, mas nos restantes $p>0.05$, com $p<0.1$ nos dias 18 (0.086), 34, 37 e 38 (0.051)). No que diz respeito à taxa de mortalidade cumulativa e taxas de sobrevivência, no entanto, observaram-se diferenças significativas entre os dois grupos (Figura 1B e C, χ^2 $p<0.002$), com a ausência da proteína Nogo a conferir maior probabilidade de sobrevivência.

^f Gostaríamos de manifestar desde já o nosso sentido agradecimento a Binhai ZHENG e a Marc TESSIER-LAVIGNE pela sua colaboração neste projecto, e por nos terem facultado os ratinhos Nogo *knockout*.

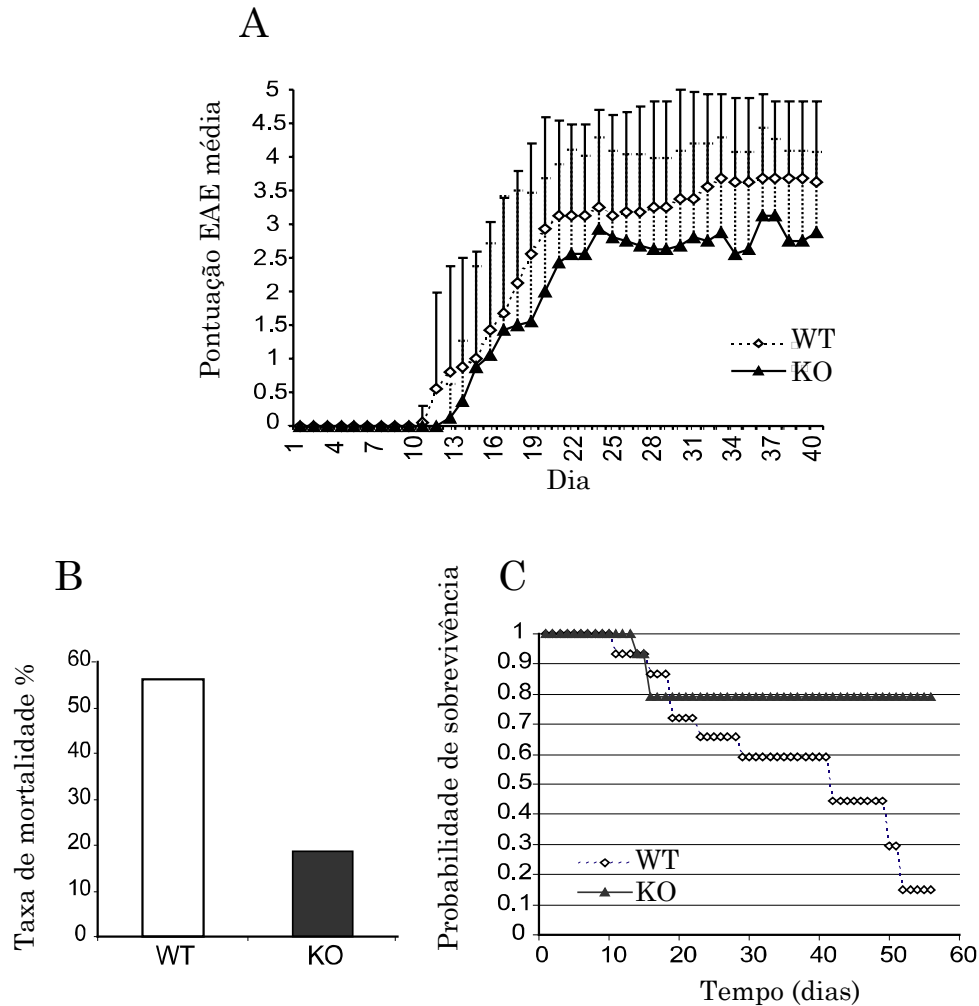


Figura 1. Indução de EAE em ratinhos Nogo-A/B/C *knockout*. A - Evolução clínica das pontuações médias de EAE (\pm desvio padrão) após a indução de EAE com o péptido MOG35-55 (100 μ g/animal/s.c.) em ACF e PTX (300 ng/animal/e.v. em duas doses separadas de 48 horas a partir da imunização). Resultados de duas experiências combinadas, comparando ratinhos C57BL/6 controlo (WT, \diamond , linha pontilhada) e Nogo *knockout* (KO, \blacktriangle , linha sólida) (total combinado n=16 para ambos os grupos). B - Taxa de mortalidade cumulativa das duas experiências. C - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para ratinhos controlo (WT) e *knockout* (KO).

A avaliação histológica de secções microscópicas do Sistema Nervoso Central, no final desta experiência, efectuada no sentido de avaliar a extensão das lesões desmielinizantes, mas, também, a capacidade regenerativa axonal na ausência deste inibidor do recrescimento, não revelou diferenças significativas, quer no número e tipo de lesões, quer na

extensão e tipo de patologia axonal, avaliada através de colorações axonais (Figura 2A-D). O problema da avaliação da presença de modificações na capacidade de regeneração axonal, num modelo como a EAE, assume, naturalmente, dificuldades muito maiores do que em modelos de trauma medular, onde, normalmente, esta capacidade pode ser avaliada através de técnicas de *tracing* (utilizando diversos marcadores que são transportados de forma anterógrada ou retrógrada pelos axónios). Como tal, a avaliação da patologia axonal depende, apenas, da capacidade do observador notar diferenças entre as amostras, não sendo possível quantificar as diferenças. No que diz respeito ao número de focos inflamatórios, aplicámos uma técnica de análise semiquantitativa baseada numa amostragem aleatória do Sistema Nervoso Central, com contagem do número de focos inflamatórios meníngeos e parênquimatosos presentes nos campos observados. Dessa análise (Figura 3), ressalta que não existem diferenças significativas entre o número de lesões encontradas em ratinhos *knockout* para a proteína Nogo induzidos com EAE, e os seus controlos normais, ao fim de 40 dias de doença.

A capacidade proliferativa dos linfócitos periféricos foi avaliada no final da experiência, através de ensaios de proliferação *in vitro* contra o péptido utilizado para induzir EAE (MOG35-55). Os resultados revelaram que para todas as condições de proliferação, os ratinhos *knockout* exibiam uma maior capacidade proliferativa (Figura 4A), ao contrário do que foi descrito recentemente por outros autores (17). A medição da capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferão gama, revelou, igualmente, que nos ratinhos mutantes existia um aumento significativo da sua produção de IFN γ após estimulação antigénio-específica, sendo esta capacidade idêntica para estímulos não específicos (Figura 4B).

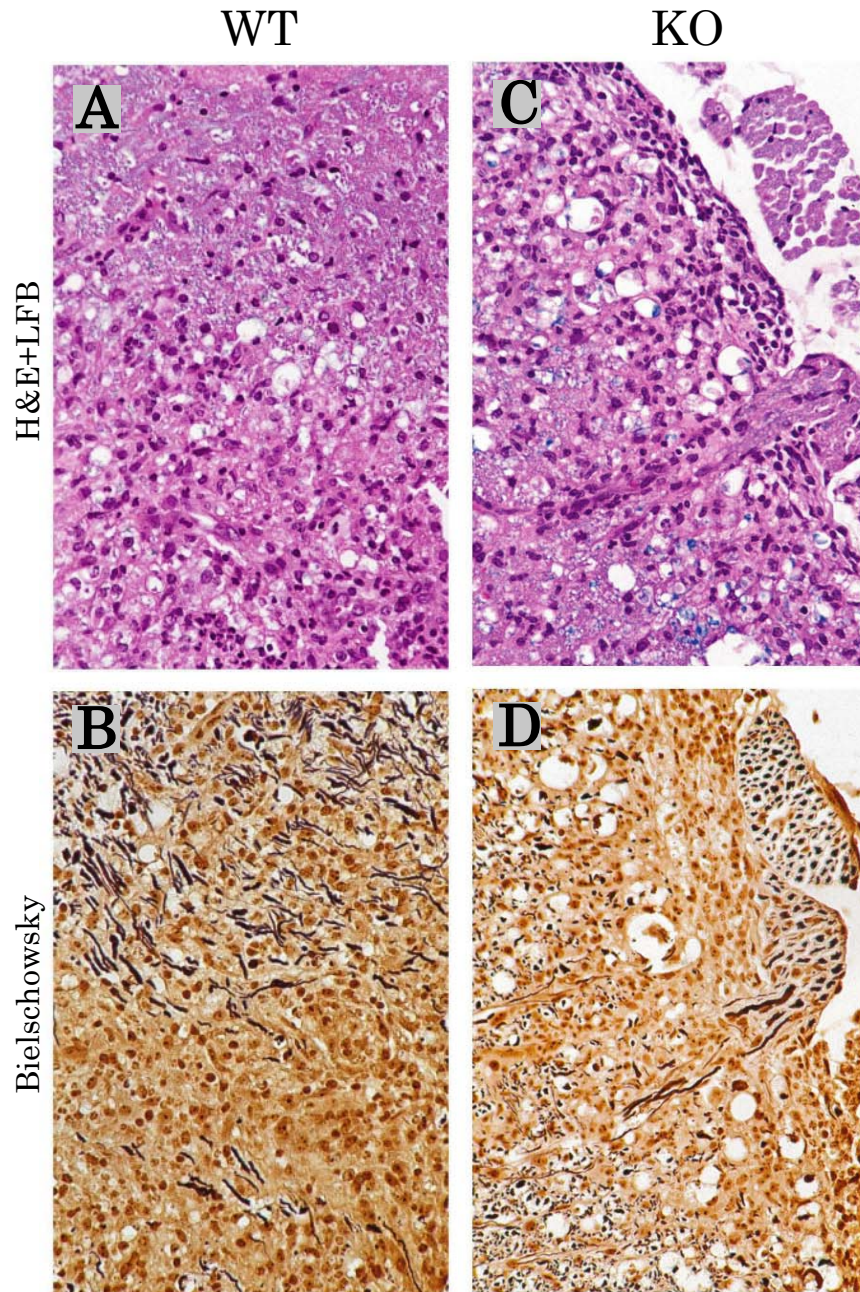


Figura 2. Avaliação neuropatológica da carga lesional no SNC de ratinhos Nogo *knockout* e controles normais com EAE. No final da experiência anterior, os ratinhos foram sacrificados, perfundidos com formalina a 10% e o encéfalo retirado, fixado e incluído em parafina. Cortes microscópicos incluídos em parafina de lesões ilustrativas de EAE induzida com MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. em duas doses separadas de 48 horas a partir da segunda imunização), em ratinhos controle (WT - A, B) e Nogo *knockout* (KO - C, D). C, E - coloração Luxol fast blue + hematoxilina/eosina. D, F - impregnação com prata pelo método BIELSCHOWSKY para visualização de axônios. Todas as imagens com ampliação de 228x.

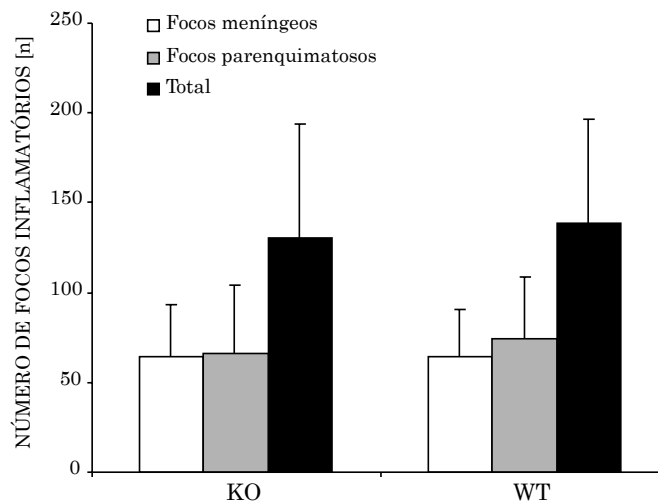


Figura 3. Avaliação neuropatológica da carga lesional no SNC de ratinhos Nogo *knockout* e controles normais com EAE. No final da experiência anterior, os ratinhos foram sacrificados, perfundidos com formalina a 10% e o encéfalo retirado, fixado e incluído em parafina. Análise semiquantitativa do número de lesões desmielinizantes/inflamatórias meníngeas e parênquimatosas observáveis em cortes microscópicos de ratinhos controle (WT, n=6) e *knockout* para a proteína Nogo (KO, n=13), com EAE induzida com o péptido MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. em duas doses separadas de 48 horas a partir da imunização). Os resultados mostrados são a média de lesões observadas ± desvio padrão de amostras individuais.

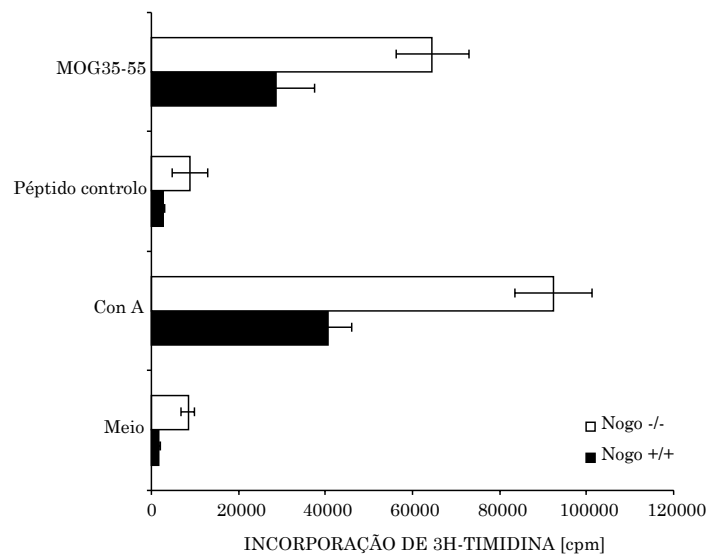


Figura 4A - Ensaios de proliferação linfocitária em ratinhos Nogo *knockout* (estirpe NC, n=10) ou normais (WT, n=10) após indução de EAE com MOG35-55. No dia 39 pós-imunização, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados e culturas linfocitárias estabelecidas e ensaios de proliferação realizados contra o péptido MOG35-55, controle (Vβ5.1) e concanavalina A (Con A). Todos os péptidos a 20 µg/ml, concanavalina A a 5 µg /ml, linfócitos a 0.5x10⁶/poço. Resultados mostrados são contagens médias por minuto (cpm) ± desvio padrão de amostras triplicadas.

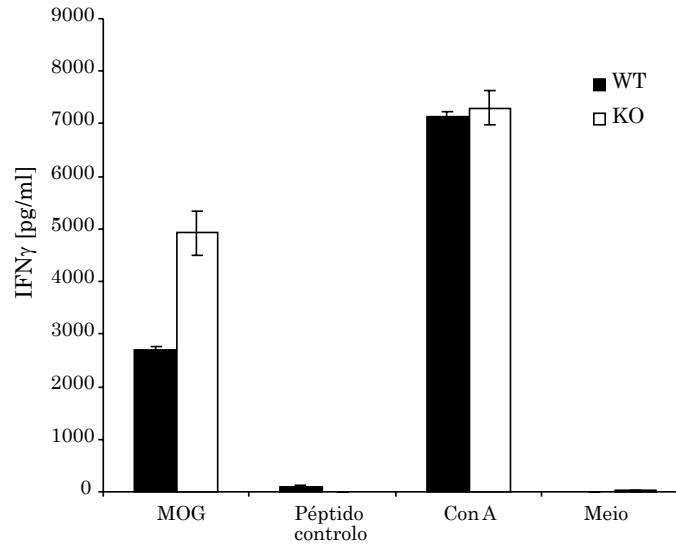
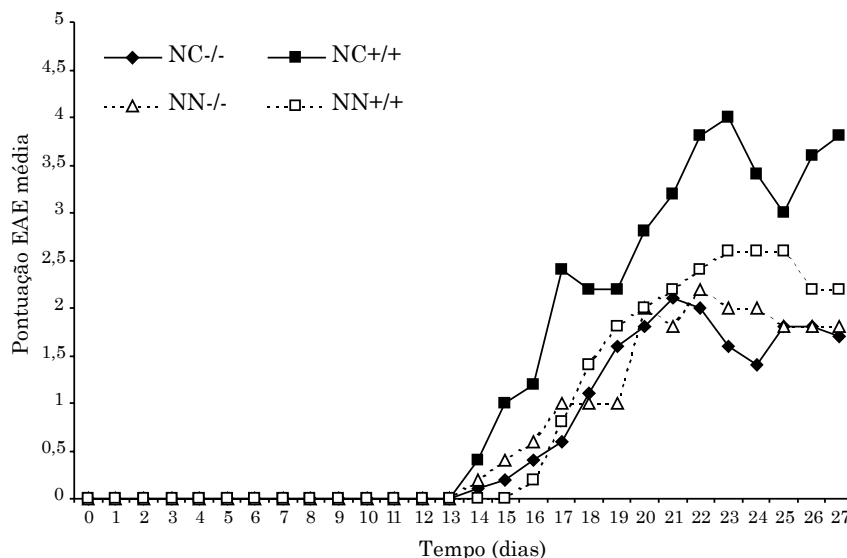


Figura 4B – Ensaio de produção de interferon γ após estimulação *in vitro* em ratinhos Nogo *knockout* (estirpe NC, n=10) ou normais (WT, n=10) após indução de EAE com MOG35-55. As mesmas células (2.5×10^6 células/ml) utilizadas para o ensaio de proliferação anterior foram estimuladas com o péptido MOG35-55, controle (V β 5.1) ou concanavalina A. O sobrenadante foi colhido 48 horas após o início do ensaio, e a presença de IFN γ detectada por ELISA. Todos os péptidos a 10 μ g /ml, concanavalina A a 5 μ g/ml. Resultados mostrados são a média \pm desvio padrão de amostras triplicadas.

Numa experiência posterior, comparámos a indução de EAE em duas estirpes mutantes diferentes no mesmo *background* H-2^b (NC^{-/-} e NN^{-/-}), que diferem na presença das diferentes isoformas desta molécula. Assim, enquanto a estirpe Nogo NC^{-/-} é nula para Nogo-A e B, e hipomorfa ou nula para Nogo-C, a estirpe NN^{-/-} mantém a expressão de Nogo-C. Após a indução de doença com o péptido MOG35-55, verificou-se, novamente, uma diferença significativa entre a gravidade de doença e a taxa de mortalidade entre os mutantes NC^{-/-} e os seus controlos normais (Figura 5). Ao invés, entre as estirpes mutantes NN não se verificaram diferenças significativas, no que diz respeito a qualquer dos parâmetros analisados (Figura 5). No que diz respeito à capacidade proliferativa dos linfócitos periféricos, realizámos ensaios de proliferação *in vitro* no final da experiência, e que não mostraram, igualmente, diferenças significativas na proliferação para ambas as estirpes mutantes de ratinhos utilizadas nas nossas experiências (Figura 6). A análise do número de focos inflamatórios presentes no SNC do

mutante NN também não mostrou alterações significativas em relação aos seus controlos normais (Figura 7).



	n	Incidência total %	Pontuação máxima	Taxa mortalidade %
NC+/+	5	100	4.0±0.7	40
NC -/-	10	100	2.1±1.1	0
NN+/+	5	100	2.6±1.5	20
NN-/-	5	80	2.2±1.8	20

Figura 5. Indução de EAE em duas estirpes mutantes para a proteína Nogo-A/B/C (NC^{-/-} e NN^{-/-}). Evolução clínica da pontuação média EAE em doença induzida com péptido MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300ng/animal/e.v. duas doses separadas de 48 horas a partir da imunização) em ratinhos Nogo *knockout* com dois tipos de mutação (NC^{-/-} e NN^{-/-}) e seus controlos normais (NC^{+/+} e NN^{+/+}). Na tabela anexa, estão apresentados os valores da incidência total cumulativa, pontuação máxima atingida (média ± desvio padrão) e taxa de mortalidade cumulativa.

Baseados nestes resultados, concluímos que, dadas as diferenças entre mortalidade e gravidade da doença induzidas nos ratinhos KO para a proteína Nogo, e, uma vez que não nos foi possível demonstrar diferenças entre a capacidade proliferativa dos linfócitos T contra o antígeno indutor da doença (MOG35-55), na sua capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN γ nem na existência de maior número de lesões desmielinizantes avaliadas por histologia, a explicação para as diferenças de curso clínico deveria estar relacionada com alguma capacidade imunomoduladora própria da referida proteína.

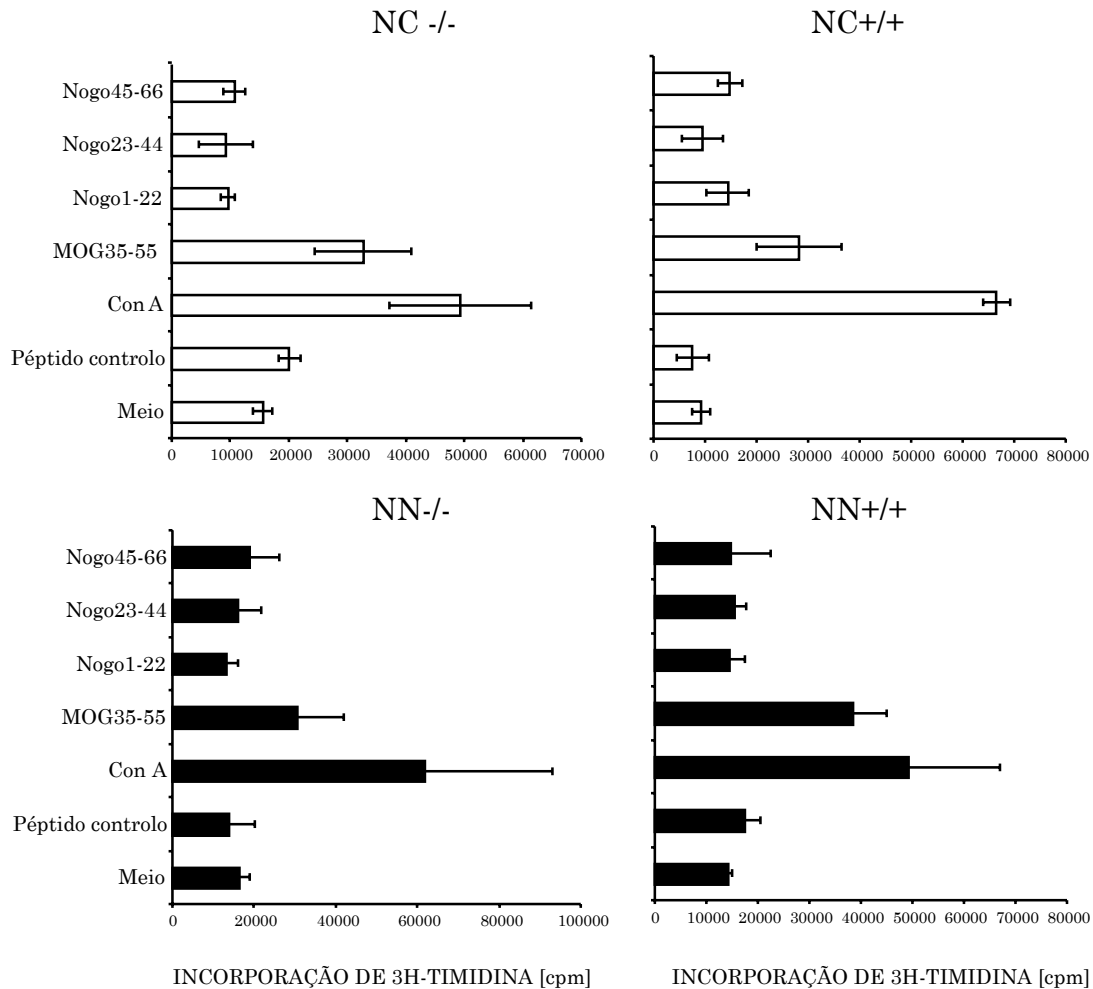


Figura 6. Ensaio de proliferação *in vitro* nas estirpes mutantes NC-/- e NN-/-. No dia 27 pós-indução de EAE com o péptido MOG35-55 (100 µg/animal/s.c.) e PTX (300 ng/animal/e.v. em duas doses separadas de 48 horas a partir da imunização), os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas e a proliferação testada contra um painel de péptidos, incluindo o péptido indutor (MOG35-55), péptidos Nogo (Nogo1-22, 23-44 e 45-66), péptido controlo (Vβ5.1) e concanavalina A (Con A). Todos os péptidos a 10µg/ml, concanavalina A a 5 µg/ml, linfócitos a 0.5x10⁶/poço. Os resultados mostrados são a contagens média por minuto (cpm) ± desvio padrão de amostras triplicadas.

Dado que as diferenças observadas foram sobretudo aparentes para o mutante NC, no qual toda a região C-terminal não existe, inferimos que seria esta região, contendo a putativa sequência extracelular de 66 aminoácidos, Nogo-66, que poderia ter um papel específico como autoantígeno capaz de modular o curso clínico da EAE. Sendo extracelular, esta região teria, igualmente, maiores potencialidades para interagir com as

células e moléculas do sistema imune, para além de interferir com o recrescimento axonal.

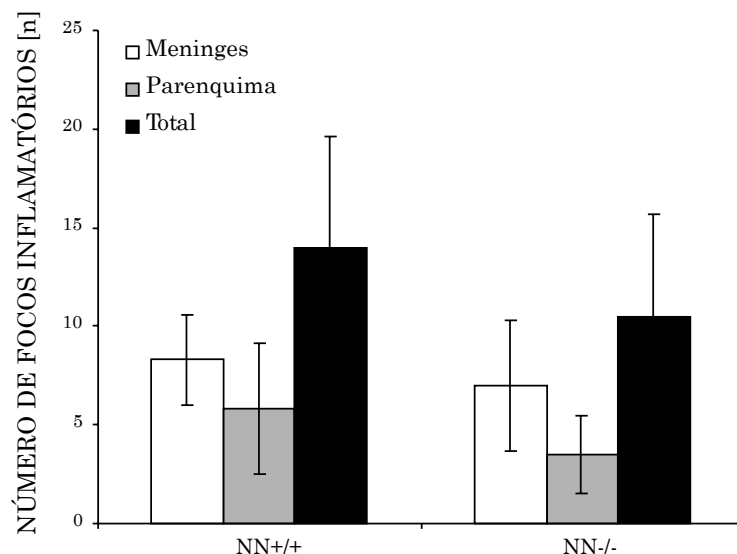


Figura 7. Avaliação neuropatológica da carga lesional no SNC de ratinhos Nogo knockout (estirpe NN-/-) e controles normais (+/+) com EAE. No final da experiência anterior, os ratinhos foram sacrificados, perfundidos com formalina a 10% e o encéfalo retirado, fixado e incluído em parafina. Análise semiquantitativa do número de focos inflamatórios/desmielinizantes a partir de cortes microscópicos (n=4 para ambos os grupos; incidência de doença 3/4 para NN+/+, 2/4 para NN-/-). Os resultados mostrados são a média de lesões observadas \pm desvio padrão de amostras individuais.

3. Estudos de estrutura molecular primária da região Nogo-66 e comparações com outras proteínas de mielina.

Na altura da realização deste estudo, não era conhecida a estrutura secundária da sequência Nogo-66 (publicada, entretanto, de forma parcial, para a região Nogo1-40 (18)). Como tal, efectuámos a modelação por computador da estrutura primária da sequência Nogo-66 e, igualmente, da região Nogo p472 (funcionalmente importante do ponto de vista de regeneração axonal, e entretanto denominada Nogo623-640). Comparámos, desta forma, estas regiões da proteína Nogo com as sequências de outros antígenos de mielina de importância conhecida para a EAE (tais como o péptido MOG35-55 ou o péptido PLP139-151, regiões imunodominante para as estirpes C57BL/6 e SJL/J, respectivamente), com base na sequência de aminoácidos conhecida. O resultado (Figura 8), comparando a estrutura de 4

sequências da proteína Nogo-A com potencial importância (três derivadas da sequência Nogo-66, e a região p472, ou Nogo623-640), e os péptidos MOG35-55 e PLP139-151 não revelou semelhanças evidentes entre as suas estruturas primárias que pudesse fazer prever a existência de regiões antigénicas.

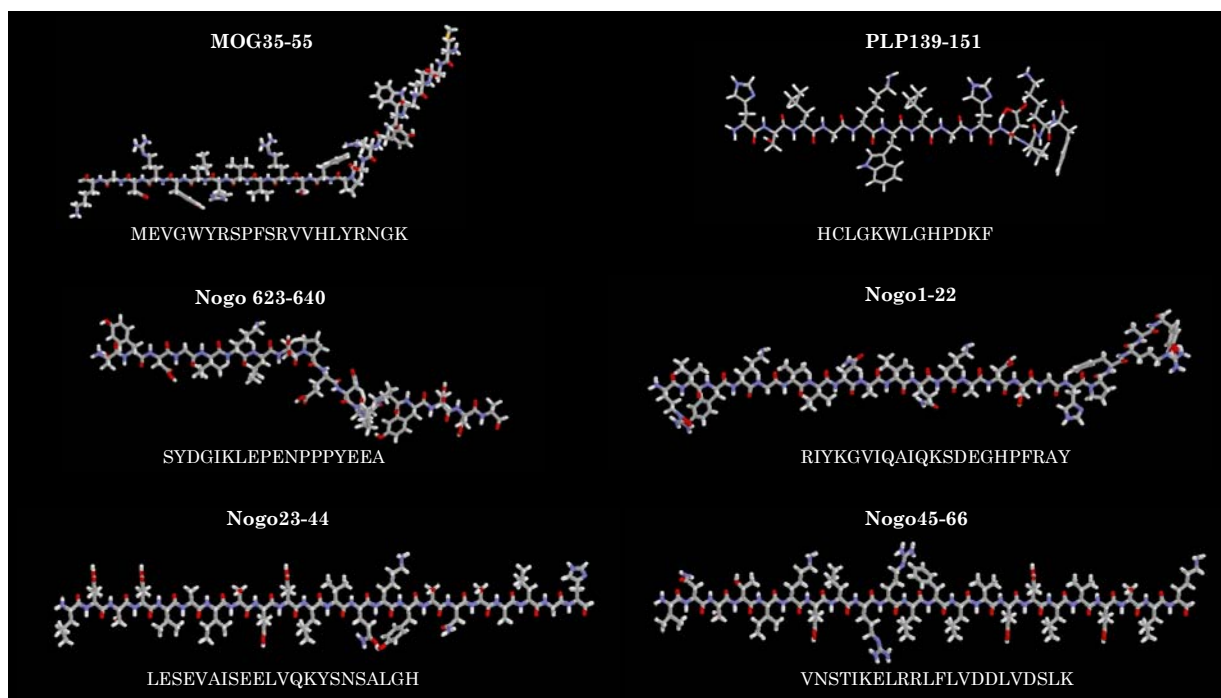


Figura 8. Estrutura primária dos péptidos Nogo. Representados em *stick model* estão os péptidos MOG35-55, PLP139-151 e quatro regiões funcionalmente importantes da proteína Nogo-A (Nogo623-640, e três péptidos – Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66 - que no seu conjunto formam a região Nogo-66). Previsão de estrutura primária por modelação de computador baseada na sequência de amino-ácidos para cada péptido (colocada em baixo de cada modelo de estrutura primária).

Baseados na sequência primária de aminoácidos conhecida para a sequência Nogo-66, propusemo-nos identificar potenciais regiões antigénicas nesta molécula através de outros métodos. Uma das formas, reconhecidas na literatura, é através da utilização de medidas como a hidropaticidade (19), polaridade (20), volume (“bulkiness”) (20) e factores de reconhecimento (21). A hidropaticidade é uma previsão da estrutura secundária de uma sequência de aminoácidos, baseada num algoritmo de cálculo que incorpora o carácter de hidrofiliidade, ou hidrofobia, de um determinado aminoácido. Na escala por nós utilizada, um programa de cálculo atribui uma pontuação

de hidropaticidade a cada aminoácido (desde +4.5 para a isoleucina – muito hidrofóbico, até -4.5 para a arginina – muito hidrofílico -) (para mais detalhes, consultar a tabela de hidropaticidade no Capítulo VI), e atribui, de forma contínua, a hidropaticidade média para um segmento de 6 aminoácidos, movendo-se desde o *terminus* amino até ao carboxi da sequência pretendida. O resultado é expresso como um gráfico, em que as porções mais hidrofílicas da sequência aparecem acima, e as hidrofóbicas abaixo, de uma linha média universal que corresponde ao valor médio para aquele péptido. Presumivelmente, para proteínas transmembranárias, as regiões mais hidrofílicas serão aquelas que, potencialmente, interagem com maior facilidade com outras moléculas, sendo resíduos de contacto eventuais para o receptor da célula T ou B, *i.e.* antígenos.

O índice de polaridade mede a força do campo eléctrico das cadeias laterais de um aminoácido (AA) actuando sobre o seu meio circundante, baseado em parte na presença de um dipólo (Fu) e em parte na carga do grupo ionizado (Fe), em relação ao centro efectivo da cadeia lateral (rr) ($F_{(e+u)} = e/r^2 + u/r^3$). Os valores variam entre 0 e 52 (para mais detalhes, consultar a tabela de polaridade no Capítulo VI), sendo que os AA com maior índice de polaridade estarão, mais provavelmente, no exterior de uma proteína no seu estado nativo, e mais facilmente interagem com AA de outras proteínas. A “bulkiness”, ou volume, de um AA é uma das suas propriedades mais fundamentais, e que se relaciona, através de interferências estéricas, com a estrutura secundária e terciária de uma proteína. Define-se como a razão entre o volume das cadeias laterais e o comprimento, o que dá, portanto, uma medida do diâmetro médio do AA. Os valores encontrados variam entre 3.4 (glicina) e 21.67 (triptofano), e reflectem a probabilidade de um AA poder interagir com outros.

Por último, utilizamos uma medida de factores de reconhecimento, desenvolvida por FRAGA (21), e que pretende incorporar não somente medidas de hidrofiliidade, mas, também, as interacções entre AA vizinhos (através de energias de interacção inter-aminoácido). Esta medida baseia-se num conjunto de regras, nomeadamente: a) assumpção que o pico mais

elevado de hidrofiliidade corresponde ou está imediatamente adjacente a regiões de importância antigénica; b) regiões com hidrofiliidade negativa (*i.e.* hidrofóbicas) nunca corresponderão a regiões com actividade antigénica; c) regiões com hidrofiliidade positiva e reconhecimento elevado não possuem determinantes antigénicos; d) regiões com hidrofiliidade positiva e reconhecimento baixo corresponderão a determinantes antigénicos. Ou seja, o potencial antigénico de um resíduo AA depende não só da sua hidrofiliidade, mas também da capacidade de interacção com outros AA. Os valores para o índice de reconhecimento variam entre 78 (alanina) e 107 (serina), tendo as regiões com pontuação mais elevada, maior probabilidade de interacção com outras proteínas.

A constituição amino-acídica da região Nogo-66 foi obtida com base na sequência publicada no GenBank (número de acesso AAM77068) e acrescentada de 6 AA antes do seu início e depois do seu *terminus*, de forma a ser possível analisar pelos programas de cálculo. Tal como se pode observar (Figura 9 e 10), são evidentes pelo menos três regiões com potencial relevância antigénica na sequência Nogo-66. No caso da hidropaticidade, identificam-se três regiões hidrofílicas principais, entre os AA 8-24, AA 33-43 e 47-52, e com potencial importância antigénica (Figura 9A). Em relação ao volume, toda a sequência é composta de AA de volume médio, com excepção do *terminus* carboxi, onde 4 resíduos têm valores acima de 18 (AA 53-54, 58-59) (Figura 9C). O gráfico de polaridade mostra, igualmente, a presença de três regiões com valores acima da média (21), nomeadamente entre os AA 13-18, AA 28 e AA 50-57 (Figura 9D). Por último, existe uma região no *terminus* carboxi com valores elevados na escala de factores de reconhecimento, entre os AA 36-51 (Figura 9B). Com base nestas quatro medidas, foi-nos possível dividir, arbitrariamente, a sequência Nogo-66 em três sequências subsidiárias, cada uma das quais contendo uma região potencialmente antigénica: Nogo1-22 (hidropaticidade negativa, volume baixo, polaridade elevada), Nogo23-44 (hidropaticidade negativa, volume baixo, factores de reconhecimento elevados) e Nogo45-66 (hidropaticidade negativa, factores de reconhecimento elevados, polaridade elevada). A

divisão da sequência Nogo-66 permitiu-nos, também, sintetizar artificialmente cada uma das sequências subsidiárias, facilitando assim o processo de indução de respostas imunes, como se verá a seguir.

Nº AA	AA	Hidrop	Vol	Frec	Polar	Nº AA	AA	Hidrop	Vol	Frec	Polar	Nº AA	AA	Hidrop	Vol	Frec	Polar
1	R	0,022	15,473	89,667	11,894	23	L	-0,111	15,91	86,111	17,299	45	V	0,633	14,558	89,111	6,522
2	I	0,567	16,118	89,222	11,724	24	E	-0,222	14,988	85,778	17,26	46	N	0	15,026	90,111	12,022
3	Y	0,567	16,118	89,222	11,724	25	S	0,778	15,779	85	11,497	47	S	-0,811	14,156	89,333	17,552
4	K	0,267	16,671	87	11,931	26	E	0,489	15,553	88,222	11,682	48	T	-0,344	16,156	89,444	17,567
5	G	0,156	15,749	86,667	11,892	27	V	0,244	15,058	87,556	17,048	49	I	-0,489	16,221	90,667	17,611
6	V	1,156	16,54	85,889	6,129	28	A	-0,567	14,188	86,778	22,578	50	K	-1,456	15,411	91,333	23,374
7	I	0,267	15,768	85,778	6,507	29	I	0,244	15,058	87,556	17,048	51	E	-0,644	16,364	90,333	23,013
8	Q	-0,022	15,51	86,111	11,828	30	S	0,8	16,402	85,556	16,877	52	L	-0,244	17,512	87,444	22,867
9	A	0,322	14,817	88,333	6,513	31	E	0,8	16,5	86,556	11,724	53	R	0,256	18,138	86,556	22,697
10	I	-0,022	15,737	88	12,036	32	E	-0,1	15,849	86,333	17,21	54	R	0,222	18,157	86,667	22,697
11	Q	-0,878	14,848	86,778	17,566	33	L	-0,444	16,574	87	17,389	55	L	0,267	17,709	86	22,719
12	K	-1,422	12,848	86,333	17,551	34	V	-1,033	15,249	89,111	17,56	56	F	0,267	17,499	86,333	22,697
13	S	-1,389	12,763	86	22,892	35	Q	-1,333	15,621	87,667	17,75	57	L	0,267	17,499	86,333	22,697
14	D	-1,767	13,422	87,444	23,068	36	K	-1,033	15,166	90,889	12,391	58	V	1,233	18,309	85,667	16,933
15	E	-1,956	13,244	86,667	23,092	37	Y	-0,444	14,936	90,889	6,847	59	D	1,344	18,02	84,111	16,678
16	G	-2,067	13,226	87,556	28,478	38	S	-0,444	14,936	90,889	6,847	60	D	0,833	16,694	86,556	16,849
17	H	-1,433	12,758	86,556	22,978	39	N	-0,956	12,917	90,333	6,832	61	L	0,944	16,872	87	16,824
18	P	-1,489	13,709	84	22,971	40	S	-0,922	12,832	90	12,173	62	V	0,089	16,24	87,222	22,31
19	F	-0,678	14,789	84,444	17,463	41	A	-0,022	13,483	90,222	6,688	63	D	-0,067	16,043	86,333	22,334
20	R	-0,678	14,789	84,444	17,463	42	L	-0,267	12,904	91,333	6,884	64	S	0,522	16,023	86	16,812
21	A	-0,722	15,463	87	17,649	43	G	-0,267	12,904	91,333	6,884	65	L	1,378	17,122	86,889	11,304
22	Y	-0,756	15,45	86,333	17,46	44	H	0,044	13,232	91,222	6,693	66	K	1,378	17,122	86,889	11,304

Figura 9. Análise de estrutura primária do péptido Nogo-66. Pontuações nas medidas de hidropaticidade (Hidrop), volume (Vol), factores de reconhecimento (Frec) e polaridade (Polar) para a sequência Nogo-66, dividida em três regiões: Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66. Assinaladas a amarelo as pontuações mais baixas, e a laranja as mais elevadas, para cada medida. Nº AA (número de aminoácido), AA (aminoácido, representado na convenção de letra única).

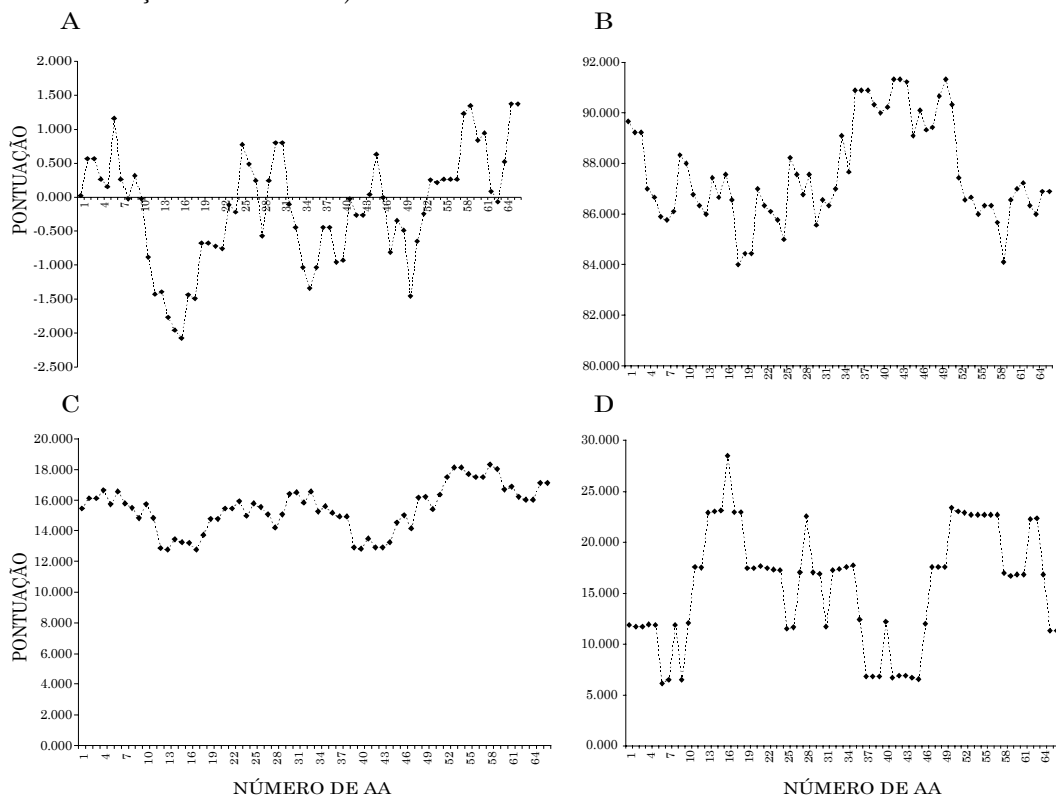


Figura 10. Análise de estrutura primária do péptido Nogo-66. Mapas de hidropaticidade (A), factores de reconhecimento (B), volume (C) e polaridade (D) calculados para a estrutura primária da sequência Nogo-66 (AA numerados de 1 a 66 para a sequência Nogo-66).

Comparando as sequências parciais dos péptidos Nogo seleccionados (e referidos a partir deste momento apenas pela sua nomenclatura reduzida), no que diz respeito às mesmas medidas de previsão de antigenicidade, com os péptidos MOG35-55 e PLP139-151, podemos observar algumas semelhanças e diferenças (Figura 11). No que diz respeito à sequência PLP139-151, não existem diferenças significativas em relação às medidas de volume ou factores de reconhecimento, comparativamente com qualquer dos péptidos Nogo. Tal como estes, a sequência PLP contém uma região de hidropaticidade negativa e elevada polaridade na sua região C-terminus. Em relação ao antigénio MOG35-55, este apresenta índices de volume um pouco maiores que as sequências Nogo, valores para factores de reconhecimento mais elevados em média, e igualmente um *terminus* carboxi com hidropaticidade negativa e polaridade elevada. No seu conjunto, todas estas comparações permitem concluir que do ponto de vista de estrutura primária, qualquer das sequências Nogo parciais têm o potencial de ser um bom antigénio para a resposta imune.

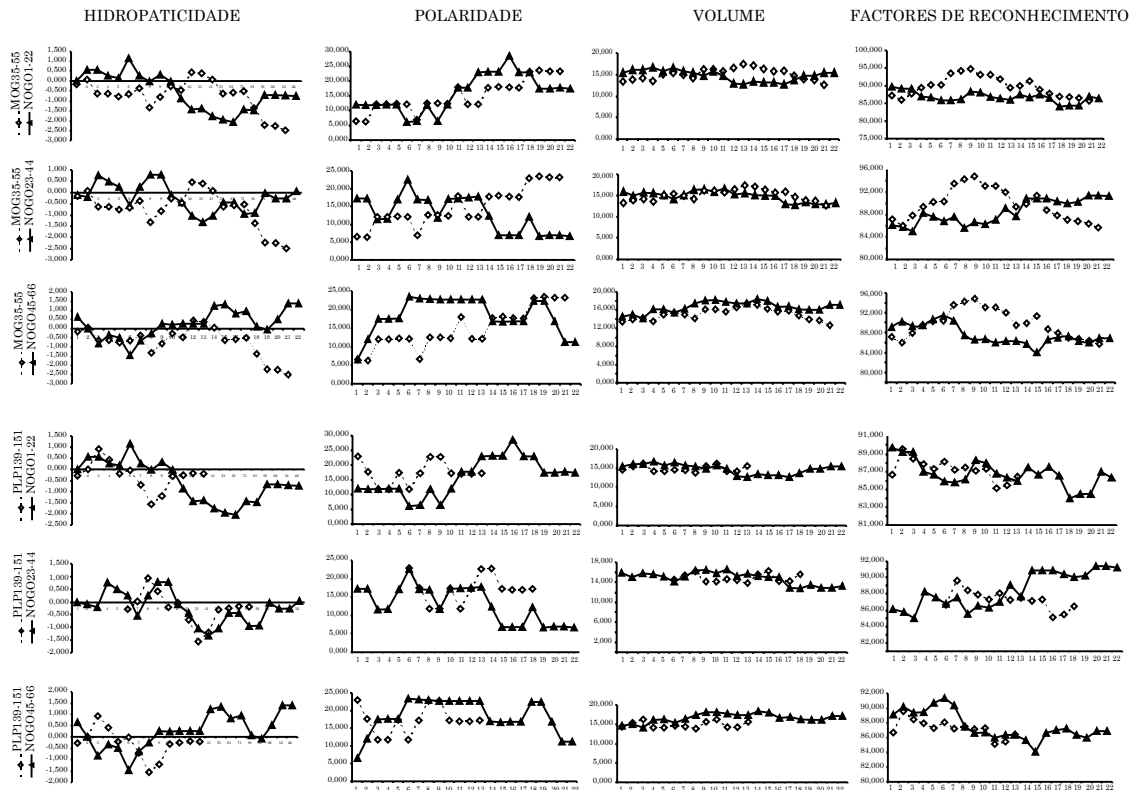


Figura 11. Análise de estrutura primária dos péptidos Nogo. Comparação das medidas de hidropaticidade, volume, polaridade e factores de reconhecimento entre os péptidos encefalitogénicos MOG35-55 e PLP139-151, e os péptidos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66. Valores obtidos para as sequências parciais dos péptidos Nogo baseadas nos resultados anteriores; para os péptidos MOG e PLP, obteve-se a sequência de ambas as regiões encefalitogénicas a partir da literatura, e acrescentaram-se AA antes e depois conforme a sequência publicada no *GenBank*.

4. Estudos de comparação de homologia da proteína Nogo-A com outras proteínas de mielina, e estudos de previsão de locais de ligação a moléculas de apresentação de antígeno do complexo MHC.

Dado o eventual interesse da sequência Nogo-66, como potencial antígeno dentro do contexto de reacções de desmielinização autoimune no SNC, procurámos encontrar homologias estruturais possíveis com outros antígenos de mielina, cuja importância tivesse já sido demonstrada anteriormente, quer em modelos animais, quer em doentes com Esclerose Múltipla. Uma das formas possíveis de o fazer consiste na utilização de algoritmos de homologia, tal como o programa de alinhamento múltiplo de sequências ClustalW. Este programa produz alinhamentos entre sequências de ADN ou proteínas, calcula o melhor resultado para as sequências seleccionadas, e alinha-as de maneira a que as identidades, similitudes e diferenças se tornem aparentes. Normalmente, utiliza-se este tipo de análise para encontrar semelhanças entre proteínas ou sequências de ADN, assumindo-se que existe um ancestral comum entre as sequências. De entre os vários tipos de análises possíveis, escolhemos utilizar uma matriz Blosum (*Blocks Substitution Matrix*), baseada nos padrões de substituição encontrados nas regiões mais conservadas das sequências. Este tipo de matriz é a normalmente utilizada em pesquisas BLAST dentro do GenBank, sendo a mais sensível para encontrar alinhamentos locais entre sequências relacionadas (22-25).

Utilizando esta estratégia, colocámos a sequência Nogo-66, e a dos péptidos Nogo seleccionados, em comparação com as sequências conhecidas para as proteínas MBP, MOG, MAG e PLP do ratinho, recorrendo a dois programas ClustalW (uma vez que utilizam matrizes com significância estatística diferente). Os resultados da comparação da sequência dos péptidos parciais com a das referidas proteínas (Figura 12) mostram haver alguma homologia com todas estas, embora de uma forma geral, apenas com base em semelhanças de grupo de AA, e não propriamente em identidade de sequência. Curiosamente, existe homologia parcial entre a sequência Nogo1-22 e a região PLP139-151, bem como entre a sequência Nogo45-66 e uma região da MOG justa ao *C-terminus* do péptido 35-55 (Figura 12). No entanto, nem uma nem outra homologia parecem ser fortes o suficiente para merecer atenção. Quando comparamos a sequência completa da Nogo-66 com as mesmas proteínas, utilizando duas matrizes Blosum diferentes (Figura 13A e B), os resultados não demonstram qualquer sobreposição com os epítomos encefalitogénicos conhecidos para estas proteínas, com a excepção de alguma homologia com o epítipo AcMBP1-11 e MAG400-415 (Figura 13A). De outra forma, não parecem existir homologias evidentes que possam explicar reacções imunes cruzadas ou mimica molecular entre a sequência Nogo-66 e os encefalitogénios mais importantes da mielina do SNC.

Por último, utilizámos programas de identificação de locais de potencial ligação a moléculas de MHC de classe I e classe II humanas, de forma a identificar regiões em toda a proteína Nogo-A que, pela sua sequência primária, pudessem estar envolvidas na reacção imune contra a mielina. No que diz respeito a moléculas de MHC classe I, e uma vez que não existe nenhuma forte associação com qualquer alelo para a EM, comparámos a sequência completa da Nogo-A com todos os alelos classe I disponíveis na altura. Os resultados dessa comparação (Figura 14) revelam que, dentro dos alelos com associação possível à EM, como o HLA-A*0201, HLA-A*0205 ou HLA-B*0702, há algum potencial de ligação com péptidos

NOGO1-22	-----RIYKGVIAIQ---KSDEGHPFRAY---
MBP	DVMASQKRPSQRSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFSGDRGAPKRGSGKD : .*:::* ..*.* * *
NOGO1-22	-----RIYKGVIAIQKSDEGHP---FRAY
MOG	FSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTTELLKETISEGKVTLRIQNVRFSDGGYTCCFFRDH . ** :: **** ** :
NOGO1-22	-----RIYKGVIAIQKSDEGHPFRAY
MAG	LLELPFQGAHRLMWAKIGPVGAVVAFAILIAIVCYITQTRRKKNVTESSSFSGGDNPHVLY * *.* :: . *. .:*. *
NOGO1-22	---RIYKGVIAIQKSDEGHPFRAY-----
PLP	QKGRGSRGQHQAHSLERVCHCLGKWLGHDPDKFVGITYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNT * :* ** . . * : :
NOGO23-44	LESEVAISEELVQKYSNSALGH-----
MBP	EDTAVTDSKHTADPKNNWQGAHPADPGNRPHLIRLFSDAPGREDNTFKDRPSESDELQOT :: *: *. .: .* .*
NOGO23-44	-----LESEVAISEELVQKYSNSALGH-----
PLP	MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYIEY : * ** . :. .. **
NOGO23-44	LESEVAISEELVQKYSNSALGH-----
MAG	LESHCAAARDTVQCLCVVKSNEPEPSVAFELPSRNVTVNETEREFVYSERSGLLLTSLIT ***. * ::: ** . .
NOGO23-44	-----LESEVAISEELVQKYSNSALGH-----
MOG	MACLWSFSWPSCFLSLLLLLQLSCSYAGQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKNA * . *: : * * *:
NOGO45-66	-----VNSTIKELRRLFL---VDD-LVDSLK-----
MBP	QEDPTAASGGLDVMASQKRPSQRSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFSGD . **:.. *: ** * :***:
NOGO45-66	-----VNSTIKELRRLFLVDDLVDLSLK-----
PLP	LINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTGG . * : *:*... :
NOGO45-66	-----VNSTIKELRRLFLVDDLVDLSLK-----
MAG	CAAARDTVQCLCVVKSNEPEPSVAFELPSRNVTVNETEREFVYSERSGLLLTSLITIRGQA * *:* .* *: .: . *
NOGO45-66	-----VNSTIKELR-RLFLVDDLVDLSLK-----
MOG	TGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTTELLKETISEGKVTLRIQNVRFSD . * * * *:.. :.. *

Figura 12. Comparação de homologia entre as sequências das proteínas MBP, PLP, MOG e MAG com a sequência dos péptidos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66. Para cada péptido Nogo, foi apenas colocada em alinhamento a região da proteína de mielina com alguma homologia, em vez da sequência completa. Identificadas a amarelo as sequências dos péptidos PLP139-151 (com o resíduo W – triptofano - de contacto com o TCR a negrito) e MOG35-55. *AA identico, : AA do mesmo grupo, . AA de grupos compatíveis.

NOGO-66	-----
MBP	MGNHSGKRELSAEKASKDGEIHRGEAGKKRSVGKLSQTASEDSDFGEADAIQNNGTSADETAVIDTSKHTADPKNNW
NOGO-66	-----RIYKGVIAIQKS--DEGHPFRAYLESEVAISEEL---VQKYSN--SALGHVNSTIK
MBP	QGAHPADPGNRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDRPSEDELQTIQEDPTAASGGLDVMASQKRPSQRSKYLATASTMD
	* * : * . * . : : * . * * * * * . * . * . * . * . *
NOGO-66	ELRRLFL--VDD-LVDSLK-----
MBP	HARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFSGDRGAPKRGSGKDSHTRTTHYGSPLQKSQHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPP
	. * : * * * : : * :
NOGO-66	-----
MBP	PSQKGGRD SRSGSPMARR
NOGO-66	-----RIYKGVIAIQKSDEGHPFR--AYLESE---VAISEELVQKYSNSALGHVNSTIKELRRLFLVDDLVDLS
PLP	MGLLECCARCLVGAPFAS-LVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLINVIHAFQYVIYGTAS
	* * * * * * : . : : * : : * . . : * : : * . *
NOGO-66	LK-----
PLP	FFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKLSATVTGGQKGRGSRGQHQHSLEKRVCHCLGKWLGHDPDKFVGI
	:
NOGO-66	-----
PLP	TYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTCQSIAPPSKTSASIGSLCADARMYGVLFPWNAFPGKVCGSNLLSICKTAEF
NOGO-66	-----
PLP	QMTFHLFIAAFVGAAATLVSLTTFMIAATYNFAVLKLMGRGTFK
NOGO-66	-----
MOG	MACLWSFSWPSCFLSLLLLLLQLSCSYAGQFRVIGPGYPICALVGEAELPCRISPGKNATGMEVGVYRSPFSRVVH
NOGO-66	-----RIYKG---VIQAIQKSDEGHP--FRAYLESEVAISEELVQK---YSNSAL
MOG	LYRNGKDQDAEQAPEYRGRTTELLKETISEGKVTLRIONVRFSDGGYTCTFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYVWNPV
	* : * * * : * * * * * : * * * * * : * . : * . :
NOGO-66	GHVNSTIKELRRLFLVDDLVDLSLK-----
MOG	LTLLIALVPTILLQVPVGLVFLFLQHLRLRGKLAEEVENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFLVIVPVLGPLVALIICYNWLH
	: : : : . * . : * :
NOGO-66	-----
MOG	RRLAQQFLE ELRNPF
NOGO-66	-----
MAG	MIFLATLPLFWIMISASRGGHWGAWMPSTISAFEGTCVSIPCRDFPDELRAVHVGVYFNSPYPKNYPPVVKSR
NOGO-66	-----
MAG	TQVVHESFQGRSRLGDLGRNCTLLSLTSPELGGKYFRGDLGGYNQYTFSEHSVLDIVNTPNIVVPPEVVAGTE
NOGO-66	-----
MAG	VEVSCMVPDNCPELRPELSWLGEGLGEPTVLGRLEDEGTWVQVSLHLFVPTREANGHRLGQAAFPNTTLQFEGY
NOGO-66	-----
MAG	ASLDVKYPPVIVEMNSSVEAIEGSHVSLLCGADSNPPPLLTWMRDGMVLREAVAKSLYLDLEEVTGPDGVDYACLA
NOGO-66	-----
MAG	NAYGQDNRTVELSVMYAPWKPTVNGTVVAVEGETVSILCSTQSNPDPILTIFKEKQILATVIYESQLQLELPAVTPE
NOGO-66	-----RIYKGVIAIQKSDEGHPFRAYLESEVAISEELVQKY---SN-----SALGHVNSTIKELRRLFL
MAG	DDGEYWCVAENQYGORATAFNLSVEFAP-IIILLESCHAAARDTVQCLCVKSNPEPSVAFELPSRNVTVNTEREFV
	. * * : * * * * * * * : : * * * * * : * * * : * . *
NOGO-66	VDDLVDLSLK-----
MAG	YSERSGLLTSILTIRGQAQAPPRVICTSRNLGYTQSLPLPFQGAHRLMWAKIGPVGAVVAFAILIAIVCYITQTRR
	. : . *
NOGO-66	-----
MAG	K KNVTESSSFSGGDNPHVLYSPEFRISGAPDKYESREVSTRDCH

Figura 13A. Comparação de homologia entre a sequência completa de Nogo-66 e as proteínas MBP, PLP, MOG e MAG utilizando ClustalW com matriz Blosum. Na sequência Nogo-66, indica-se a vermelho o péptido 1-22, a laranja o péptido 23-44 e a roxo o péptido 45-66. Estão marcados a amarelo os epítomos PLP139-151 (com o resíduo de contacto com o TCR a negrito), MBP1-11, MBP85-99 (com o motivo de contacto entre o MHC e TCR – VHFFK – a negrito, MAG400-415, e MOG 35-55. *AA idêntico, : AA do mesmo grupo, . AA de grupos compatíveis.

contidos na sequência Nogo-66. Para todos os restantes, cuja associação à EM não é clara, neste momento, surgem, com alguma regularidade, epítomos potenciais para MHC classe I contidos nas regiões com importância reconhecida na inibição do recrescimento axonal, como sendo a sequência Nogo623-640 (péptidos Nogo638-646 YEAAMSVAL, Nogo636-644 PPYEAAMSV), e a sequência Nogo-66 (péptidos Nogo1081-1089 LVDDLVDL, Nogo1068-1076 HVNSTIKEL, Nogo1077-1085 RRLFLVDDL, Nogo1073-1081 IKELRRLFL) (Figura 14). Em outros alelos com prevalência aumentada nos doentes com EM, tais como HLA-A3 e B7, não foram encontradas sequências peptídicas com pontuação suficientemente alta, ou presentes nas regiões funcionalmente importantes.

Alelo MHC	Sequência	Pos	Pont	% Max	Alelo MHC	Sequência	Pos	Pont	% Max
HLA-A1	SVDETLFAL	167	0.9163	7.44	HLA-B*5201	GQEDFPSVL	204	34.012	34.05
HLA-A2	VLFFETAASL	211	60.355	39.82	HLA-B*5301	FPSVLFETA	208	183.130	91.78
HLA-A*0201	VLFFETAASL	211	63.116	35.35		WVFTYVGAL	1096	124.830	82.11
HLA-A*0205	WVFTYVGAL	1096	57.118	54.40		PPYEEAMSV	636	123.060	80.29
	LVDDLVDL	1081	33.520	31.93	HLA-B*5401	FPSVLFETA	208	191.240	87.24
	HVNSTIKEL	1068	33.322	31.74		YEEAMSVAL	638	178.540	81.45
HLA-A24	TYEGSRDVL	382	57.038	77.33	HLA-B*51	FPSVLFETA	208	144.220	91.86
HLA-A3	GLTLLJLAL	1107	16.864	10.80		WVFTYVGAL	1096	135.200	85.44
HLA-A*3101	STPAAPKRR	155	-0.6931	0		YEEAMSVAL	638	132.530	80.22
HLA-A*3302	STPAAPKRR	155	10.986	17.98	HLA-B*5801	KSRSSVSKV	910	20.694	22.13
HLA-A68.1	STPAAPKRR	155	3.912	36.87	HLA-B60	YEEAMSVAL	638	57.683	64.42
HLA-A2.1	YLESFQPNL	776	134.700	92.45	HLA-B61	DEFPTVSA	845	40.943	51.97
	WVFTYVGAL	1096	122.100	81.47	HLA-B62	AQIDHYLGL	1130	16.639	18.09
HLA-B14	RRLFLVDDL	1077	52.983	40.70	HLA-B7	AVMLMKESL	741	51.930	47.66
HLA-B*2702	RRLFLVDDL	1077	51.930	50.37	HLA-B*0702	RSSVSKVPL	912	153.184	79.09
HLA-B*2705	RRLFLVDDL	1077	86.995	84.39		HVNSTIKEL	1068	134.420	66.97
	WVFTYVGAL	1096	39.120	37.95	HLA-B8	LTKEAEKEL	943	17.918	15.62
HLA-B*3501	NPQESPTL	325	36.889	41.53	HLA-Cw*0301	AQIDHYLGL	1130	46.052	47.20
HLA-B*3701	EDLEELEVL	48	36.889	46.07		RRLFLVDDL	1077	36.889	37.81
HLA-B*3801	TYEGSRDVL	382	24.849	31.30	HLA-Cw*0401	TYEGSRDVL	382	52.983	56.72
HLA-B*3901	RRLFLVDDL	1077	38.067	42.30	HLA-Cw*0602	RRLFLVDDL	1077	25.802	58.90
	LVDDLVDL	1081	32.958	36.62		LVDDLVDL	1081	24.849	56.73
HLA-B*3902	GQEDFPSVL	204	31.781	57.99		YEEAMSVAL	638	18.871	43.08
	IKELRRLFL	1073	29.957	54.66	HLA-Cw*0602	AKSDDSPKEY	853	19.051	35.90
HLA-B40	DEFPTFVSA	845	50.752	59.87		RRLFLVDDL	1077	17.509	33.00
	YEEAMSVAL	638	23.026	27.16	MHC-Db	GALFNGLTL	1102	66.593	70.68
HLA-B*4403	DEFPTFVSA	845	50.752	59.87	MHC-Dd	SLPPAAAVL	116	31.781	29.89
	YEEAMSVAL	638	13.863	11.84	MHC-Kb	AQIDHYLGL	1130	32.734	51.58
HLA-B*5101	VPPAAAPLL	69	49.628	48.86	MHC-Kd	TYEGSRDVL	382	77.832	93.89
	PPYEEAMSV	636	37.842	37.26	MHC-Kk	TEGTIEELTL	245	43.820	41.35
HLA-B*5102	GALFNGLTL	1102	52.013	44.57		YEEAMSVAL	638	36.889	34.81
	PPYEEAMSV	636	47.005	40.27	MHC-Ld	NPQESPTL	325	54.161	82.64
HLA-B*5103	GALFNGLTL	1102	29.857	39.46					
	PPYEEAMSV	636	26.755	35.36					

Figura 14. Identificação de potenciais locais de ligação a alelos MHC classe I humanos da proteína Nogo-A. Mostram-se todos os resultados obtidos com uma pontuação acima de 30% da pontuação máxima possível para péptidos contidos nas regiões Nogo623-640 ou Nogo-66 (assinalados a amarelo), ou o péptido com pontuação máxima para

cada alelo MHC. Pos = posição; Pont = pontuação; % Max = percentagem da pontuação máxima para o alelo.

Em relação às moléculas MHC classe II, existe uma forte associação com o haplotipo HLA-DR15 em populações caucasianas (DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602) (revisto em (8)). Tentámos identificar, como tal, regiões da proteína Nogo-A com potencial ligação aos alelos DRB1*1501 (o alelo com maior representatividade e mais frequentemente encontrado em associação à EM; a molécula MHC-II por ele codificada apresenta a sequência peptídica MBP85-99, reconhecidamente um dos epítomos mais importantes na EM), DRB5*0101, DRB1*0301 (associado a EM na população mediterrânica da Sardenha), DRB1*0405 (igualmente associado a EM na Sardenha, e também a formas de EM com bandas oligoclonais negativas no Japão), DRB1*0801 (associado a formas primariamente progressivas em doentes judeus Ashkenazi) e DRB1*1301 (dos alelos disponíveis, o mais semelhante ao DRB1*13 e DRB1*1303, associados, respectivamente, a formas benignas de EM no norte de Itália, e a EM em judeus não-Ashkenazi). Dos resultados desta análise para a proteína Nogo-A humana (Figura 15A), a primeira constatação é a de que praticamente todos os epítomos potenciais se encontram no *terminus* carboxi da molécula, região que contém a sequência Nogo-66, sobretudo nos alelos DRB1*1501 e B5*0101. Mais ainda, encontram-se, com pontuações relativamente elevadas para o alelo DRB1*1501, quatro péptidos contidos na sequência Nogo-66 (Nogo1087-1095 VQKYSNAL, Nogo1053-1061 FRIYKGVIG, Nogo1102-1110 IKELRRLFL e Nogo1072-1080 FRAYLESEV), e correspondendo, pelo menos para os três primeiros, aos péptidos seleccionados para abranger a região (Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66). No conjunto da análise dos epítomos potenciais para todos os alelos, a sequência Nogo1053-1061, que corresponde ao *terminus* amino da Nogo-66, é a que aparece com maior frequência, em quatro dos seis alelos testados.

Alelo MHC	Sequência	Pos	Pont	%Max	Alelo MHC	Sequência	Pos	Pont	%Max	Alelo MHC	Sequência	Pos	Pont	%Max	
DRB1*1501	VVFGASLFL	1018	59.000	60.20	DRB1*0301	VLPDIVMEA	609	59.000	62.11	DRB1*0405	FSIVSVTAY	1033	31.000	32.98	
	VQKYSNSAL	1087	52.000	53.06		LVEDSSPDS	733	49.000	51.58		ILALISLFS	1141	30.000	31.91	
	LLILALISL	1139	52.000	53.06		LLPDEVSTL	813	48.300	50.84		LALLSVTIS	1044	30.000	31.91	
	LFLLLSLTV	1024	51.000	52.04		LLLSLTVFS	1026	48.000	50.53		FRYKGVQIQ	1053	30.000	31.91	
	VTAYIALAL	1038	49.000	50.00		VKEDDEVSS	353	47.000	49.47		DRB1*0801	FRYKGVQIQ	1053	54.000	62.79
	FRYKGVQIQ	1053	44.000	44.90		FLVDDLVD	1109	43.000	45.26			FNEKRVAVE	368	44.000	51.16
	IVMEAPLNS	613	43.000	43.88		IVMEAPLNS	613	43.000	45.26			YENKEKLSA	781	39.000	45.35
	LKFAVLMWV	1118	41.000	41.84		FGNDFVPPA	80	42.000	44.21			MLVKESLTE	764	37.000	43.02
	LFNGLTLII	1133	38.600	39.39		VQTSEVMQE	579	39.000	41.05			FKPFERVWE	386	31.000	36.05
	IKELRRLFL	1102	38.000	38.78		LLALISLFL	1140	37.700	39.68			VKPKVLVKE	967	31.000	36.05
	ISLFSVPVI	1145	38.000	38.78		LLGDPSTEN	481	37.700	39.68			IIVKNKDEE	322	31.000	36.05
	ILALISLFS	1141	37.000	37.76		VVSSEKAKD	358	37.000	38.95			WEVKDSKED	393	30.000	34.88
	LTVFSIVSV	1030	35.500	36.22		IVANPREEI	314	37.000	38.95			LRRLFLVDD	1105	27.000	31.40
	MWVFTYVGA	1124	35.000	35.71		LTPDLVQEA	549	37.000	38.95			WVFTYVGAL	1125	26.000	30.23
	LLSLTVFSI	1027	35.000	35.71		LVDDLVDLSL	1110	36.600	38.53			YKGVQIAIQ	1056	26.000	30.23
	LALISLFSV	1142	35.000	35.71		LVDSLKFAV	1114	36.000	37.89			VVSSEKAKD	358	26.000	30.23
	VFTYVGVGALF	1126	34.000	34.69		LLSLTVFSI	1027	35.000	36.84	DRB1*1301	IVMEAPLNS	613	44.000	50.00	
	FRAYLESEV	1072	33.000	33.67		LKFAVLMWV	1118	35.000	36.84		LLSLTVFSI	1027	40.000	45.45	
	IVSVTAYIA	1035	32.000	32.65		VVFGASLFL	1018	34.600	36.42		FKYQFVREP	22	36.000	40.91	
	VFGASLFL	1019	31.000	31.63		VTISFRYIK	1049	34.000	35.79		LLSLTVFSI	1026	32.000	36.36	
	FNGLTLLIL	1134	31.000	31.63		VIRSSAENM	198	34.000	35.79		VIVANPREEI	313	30.000	34.09	
	VYSNDLFLI	838	31.000	31.63		IDRDLTEFS	284	34.000	35.79		LVQKYSNSA	1086	29.000	32.95	
	YIALALLSV	1041	30.000	30.61		LFNGLTLII	1133	34.000	35.79		LVSNILNHL	333	29.000	32.95	
	LLSLFSVPV	1144	30.000	30.61		LAAGGKIES	405	33.000	34.74		LRRLFLVDD	1105	28.000	31.82	
	VLMWVFTYV	1122	30.000	30.61		YSNDDLFI	839	33.000	34.74		LLALISLFL	1140	28.000	31.82	
	DRB5*0101	YVTTDNLTIK	528	44.000		44.90	LEVSHKSEI	891	32.700		34.42	LALLSVTIS	1044	28.000	31.82
WVFTYVGAL		1125	38.000	38.78	LALLSVTIS	1044	32.000	33.68	LFLLLSLTV		1024	28.000	31.82		
LGHVNCTIK		1095	38.000	38.78	LISSKTDSEF	873	31.000	32.63	IVANPREEI		314	28.000	31.82		
IVSVTAYIA		1035	36.000	36.73	IESIVKPKV	963	31.000	32.63	ISLFSVPVI		1145	28.000	31.82		
LLILALISL		1139	36.000	36.73	LLILALISL	1139	30.600	32.21	ILALISLFS		1141	28.000	31.82		
FRYKGVQIQ		1053	32.000	32.65	LFSDDSIDP	746	30.000	31.58	LGLANKNVK		1165	27.000	30.68		
FLLLSLTVF		1025	31.000	31.63	VLLPPDVS	947	30.000	31.58							

Figura 15A. Previsão de epítomos de ligação aos alelos de MHC classe II HLA-DRB1*1501, B5*0101, B1*0301, B1*0405, B1*0801 e B1*1301, para a sequência da proteína Nogo-A humana. Mostram-se os resultados com valores de percentagem de pontuação máxima acima de 30% para cada alelo, ordenados por ordem decrescente. Assinaladas a amarelo as sequências pertencentes à região Nogo-66. Pos = posição; Pont = pontuação; % Max = percentagem da pontuação máxima para o alelo.

Proteína	Sequência	Pos	Pont	%Max	Proteína	Sequência	Pos	Pont	%Max	Proteína	Sequência	Pos	Pont	%Max
MBP	VHFFKNIVT	85	60.000	61.22	MOG	LVLLAVLPV	155	55.000	56.12	MAG	VVAFAILIA	519	64.500	65.82
	VVHFFKNIV	84	54.000	55.10		LCSFLLLLL	12	52.000	53.06		LVLTSILTL	467	52.500	53.57
PLP	IGRFFGSDR	40	34.000	34.69		LQITVGLVF	166	44.000	44.90		MIFLTALPL	0	48.000	48.98
	FFLYGALLL	78	57.000	58.16		VLPVLLLIQI	160	43.000	43.88		IVNTPNIVV	136	48.000	48.98
	VYIYFNTWT	170	56.000	57.14		IIYCNWLHR	224	41.000	41.84		LRNCTLLS	96	45.000	45.92
	LVSLTTFMI	247	48.600	49.59		ITLFFVIVPV	208	40.500	41.33		FEFYASMDV	227	44.000	44.90
	YVIYGTASF	69	46.600	47.55		YRLRGKIRA	179	40.000	40.82		LPLFWIMIS	6	43.500	44.39
	LLVFACSAV	160	45.000	41.84		FLLLLLLVQV	15	39.000	39.80		LYGAKSLEL	492	41.000	41.84
	VPVYIYFNT	168	41.000	41.84		LGPLVALII	217	39.000	39.86		VLLLESHCA	413	37.000	37.76
	VVWLLVFAC	157	37.000	37.76		LQYRLRGKL	177	37.000	37.76		VVFKSRTQV	71	37.000	37.76
	LLLAEGFYT	84	37.000	37.76		IVPVGLPLV	213	37.000	37.76		FVYSERSGL	459	34.000	34.69
	YIYFNTWTT	171	36.600	37.35		LRGKLRAEI	181	34.000	34.69		LTIFKEKQI	356	33.000	33.67
	FHLFAIAFV	233	35.000	35.71		FVIVPVLPV	211	33.000	33.67		IVCYTTQTR	528	32.600	33.27
	FQMTFHLFI	229	34.000	34.69							VAFAILIAI	520	32.000	32.65
	LLTFMIAAT	250	32.500	33.16										

Figura 15B. Previsão de epítomos de ligação ao alelo HLA-DRB1*1501 para as proteínas de mielina MBP, PLP, MOG e MAG. Mostram-se os resultados com valores de percentagem de pontuação máxima acima de 30% para cada proteína, ordenados por ordem decrescente. Pos = posição; Pont = pontuação; % Max = percentagem da pontuação máxima para o alelo.

Como ilustração, comparámos, igualmente, esta previsão com as mesmas feitas para as proteínas MBP, PLP, MOG e MAG para o alelo DRB1*1501. Os resultados encontrados (Figura 15B) mostram que, como previsível, para a MBP é identificado o epítopo MBP85-93, abrangendo o quinteto de aminoácidos VHFFK, e que contém os locais de ligação principais à molécula de MHC e igualmente ao receptor da célula T. Para

outras proteínas, como a PLP, MOG e MAG, surgem associações parciais com epítomos conhecidos, como a PLP146-154. Comparando as pontuações destes epítomos conhecidos com as obtidas para os péptidos Nogo, torna-se aparente não haver grandes diferenças entre elas, confirmando, assim, a potencial relevância da sequência Nogo-66 como antígeno na EM.

5. Indução de respostas linfocitárias T (proliferação e fenotipagem Th) e de Encefalomielite Autoimune Experimental em estirpes susceptíveis de ratinho a partir de péptidos da sequência Nogo-66.

Pelas razões anteriormente apontadas, para avaliar o potencial da proteína Nogo-A actuar como autoantígeno-alvo para reacções desmielinizantes no SNC, concentrámos a nossa atenção no domínio Nogo-66, que, pela sua topologia membranária extracelular, poderia, mais facilmente, interagir com células e moléculas do sistema imune. Para tal, sintetizamos artificialmente três péptidos, seleccionados, arbitrariamente, para englobar toda a região Nogo-66 (Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66), e utilizámos estes péptidos numa tentativa de induzir EAE em estirpes de ratinho susceptíveis, como sendo a SJL/J e C57BL/6, utilizando protocolos desenvolvidos para quebrar tolerância a antígenos *minor*.

Do ponto de vista clínico, começando cerca de 10 dias depois da imunização, todos os animais em ambas as estirpes apresentaram sinais de fotofobia, letargia, e ausência de rituais de limpeza, e alguns tinham perda parcial de tónus muscular na cauda. Estes achados duraram cerca de 3 a 4 dias, desaparecendo depois totalmente. Os animais de controlo imunizados com PBS em ACF não apresentaram quaisquer anomalias de comportamento. Alguns dos ratinhos SJL/J imunizados com o péptido Nogo45-66 (2 em 10 no conjunto de duas experiências combinadas) apresentaram sinais típicos de EAE clínica, incluindo perda de tónus muscular na cauda, paralisia dos membros traseiros e incontinência urinária. A avaliação histológica do encéfalo e medula espinhal de ratinhos imunizados com os péptidos Nogo, para ambas as estirpes, revelou a

presença de focos inflamatórios nas meninges e parênquima, achados patológicos característicos de EAE (Figura 16A-C, 17). A análise semiquantitativa das lesões inflamatórias/desmielinizantes foi realizada em tecidos do SNC de ratinhos SJL/J e C57BL/6 imunizados com péptidos Nogo contra os quais foi possível demonstrar a presença de resposta linfocitária T. Algumas lesões inflamatórias meníngeas foram encontradas em ambas as estirpes, e lesões parênquimatosas em maior número para a estirpe SJL/J do que para a estirpe C57BL/6 (Figura 16D, 17). Num ratinho SJL/J imunizado com Nogo45-66, e que apresentava a situação clínica mais grave (pontuação=2) encontraram-se focos meníngeos numerosos (n=65) e alguns focos parênquimatosos (n=11), o que representa o extremo mais elevado do espectro patológico encontrado para este péptido. Em outro ratinho SJL/J, imunizado com Nogo1-22, foram observados 28 focos meníngeos e 32 focos inflamatórios parênquimatosos, os valores mais elevados para este péptido. Em comparação, na estirpe C57BL/6 os achados neuropatológicos foram sempre menos severos. Estes dados permitiram-nos concluir que os péptidos Nogo-66 actuam como encefalitogénios fracos em estirpes susceptíveis à EAE, como é a SJL/J.

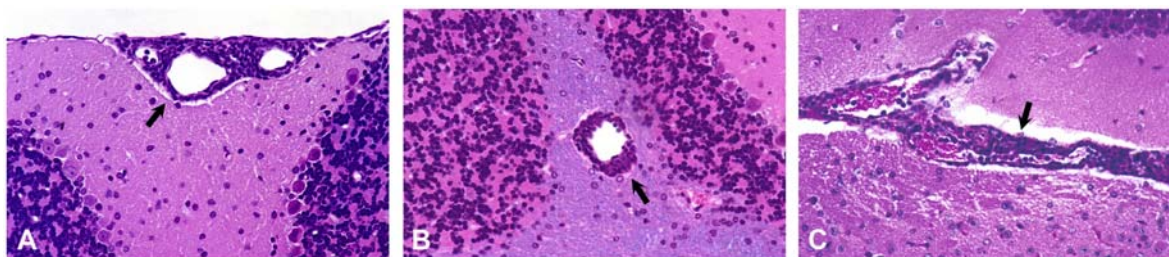


Figura 16A-C. Avaliação neuropatológica da indução de EAE com péptidos Nogo em ratinhos SJL/J e C57BL/6. Ratinhos SJL/J e C57BL/6 foram imunizados com emulsões dos péptidos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66 (100 µg/animal/s.c., duas doses separadas de 1 semana) em ACF conjuntamente com PTX (500 ng/animal/e.v. duas doses separadas de 48 horas a partir da segunda imunização), ou uma emulsão de PBS em ACF como controlo negativo. No pico da doença (cerca de dia 12 pós-imunização), os animais foram sacrificados, perfundidos com formalina a 10% e o encéfalo e medula dissecados. A e B – infiltrados meníngeos (A, seta) e perivascular parênquimatoso (B, seta) no cerebelo de um ratinho SJL/J imunizado com Nogo45-66 em ACF e que exibia sinais clínicos de EAE. C – meningite (C, seta) adjacente ao cerebelo de um ratinho C57BL/6 imunizado com Nogo1-22 e que exibia fotofobia. Coloração Luxol Fast Blue + hematoxilina/eosina. Todas as imagens com ampliação 228x.

SJL/J	Meninges	Parenquima	Total	C57BL/6	Meninges	Parenquima	Total
PBS (n=5)	0.7±0.8	0.8±1.3	1.5±1.6	PBS (n=5)	0.6±0.4	0.2±0.2	0.8±0.3
Nogo1-22 (n=16)	3.7±7.2	2.8±7.9	6.5±14.7	Nogo1-22 (n=10)	2.7±0.9	0.5±0.5	3.2±1.3
Nogo45-66 (n=11)	7.8±18.7	2.2±3.0	10±21.7	Nogo23-44 (n=10)	1.6±0.9	0.6±0.4	2.2±1.2

Figura 16D. Avaliação neuropatológica da carga lesional no SNC de ratinhos SJL/J e C57BL/6 com EAE induzida com péptidos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66 em ACF, ou controle negativo PBS em ACF. Análise semiquantitativa de focos inflamatórios no SNC a partir de cortes microscópicos em ratinhos SJL/J e C57BL/6; os resultados são a média±desvio padrão das amostras observadas. Existem focos inflamatórios meníngeos em ambas as estirpes, e focos desmielinizantes parenquimatosos predominantemente na estirpe SJL/J com manifestações clínicas de EAE.

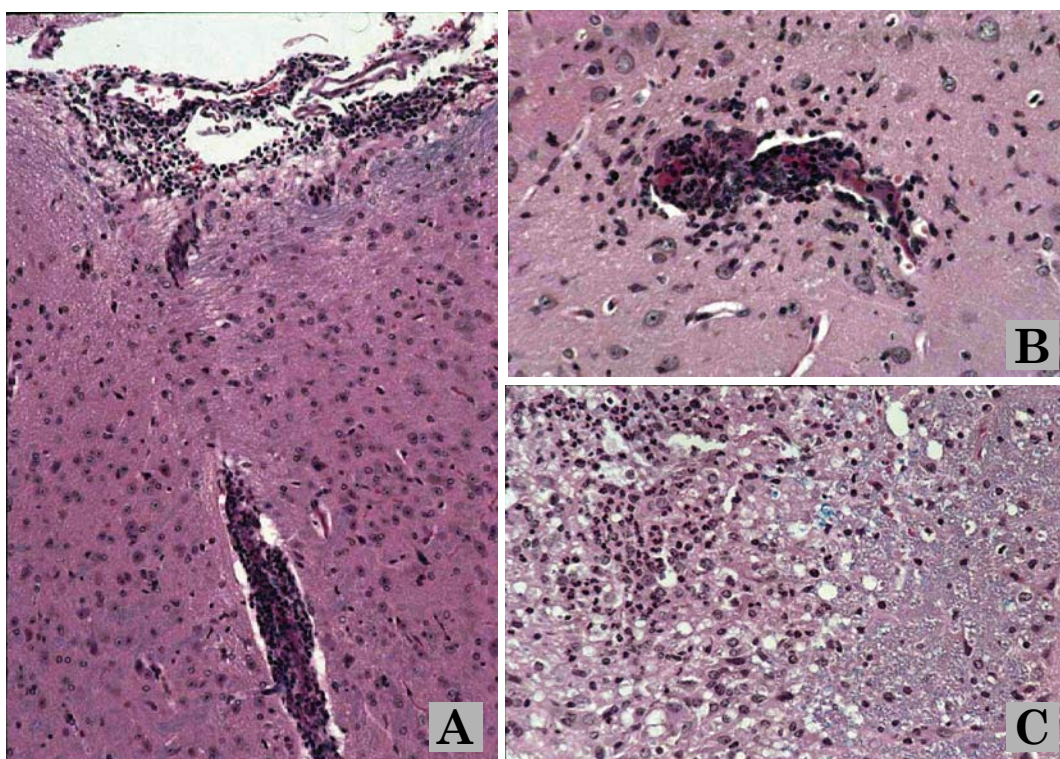


Figura 17. Detalhes da avaliação neuropatológica da indução de EAE com péptidos Nogo. Demonstração de achados característicos de EAE em ratinhos SJL/J, após imunização com o péptido Nogo45-66. A – Foco cerebral meníngeo e perivascular (Luxol Fast Blue + hematoxilina/eosina, 228x). B – Detalhe de um infiltrado perivascular intraparenquimatoso, em que são visíveis numerosos linfócitos a penetrar no parênquima encefálico (Luxol Fast Blue + hematoxilina/eosina, 400x). C – Detalhe de lesão desmielinizante no parênquima encefálico; são visíveis numerosas células mononucleadas, bem como uma extensa lesão com vacuolização e desagregação da mielina (Luxol Fast Blue + hematoxilina/eosina, 400x).

A avaliação da resposta linfocitária T após imunização com os péptidos Nogo-66 foi feita através de ensaios de proliferação *in vitro*; para tal, foram colectados os gânglios linfáticos de drenagem no final das experiências e testada a proliferação contra um painel de péptidos Nogo-66, e controlos. Encontrámos, desta forma, uma reacção proliferativa muito forte, e específica para o péptido utilizado na imunização, em ratinhos SJL/J imunizados com Nogo1-22 e Nogo45-66, e igualmente em ratinhos C57BL/6 imunizados com Nogo1-22 e Nogo23-44, indicando algumas diferenças entre estas duas estirpes no que diz respeito aos seus epítomos de célula T (Figura 18).

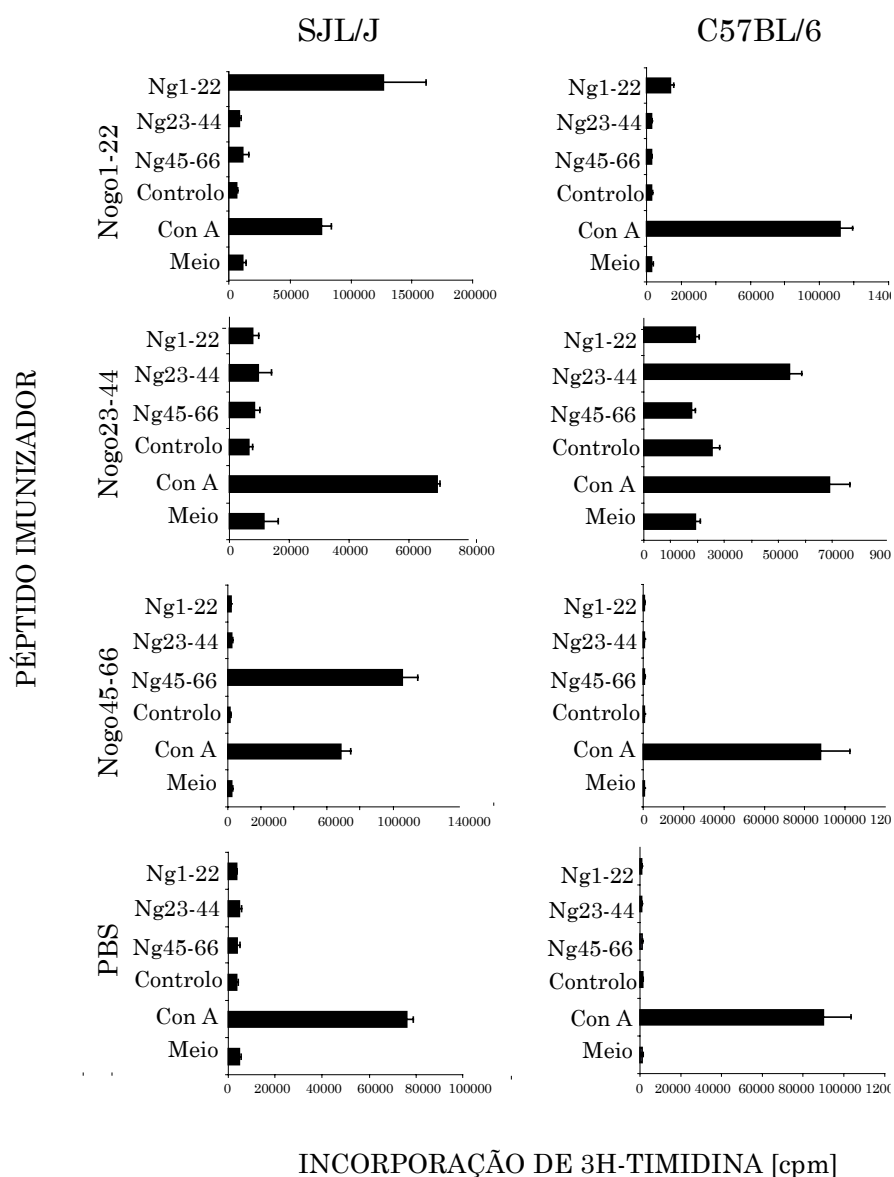


Figura 18. Indução de respostas proliferativas linfocitárias após imunização com péptidos Nogo. Trinta dias após a imunização, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados e ensaios de proliferação realizados contra péptidos Nogo (Ng1-22, Ng23-44, Ng45-66), controlo (Vβ5.1), concanavalina A (Con A) ou meio de cultura (meio). Todos os péptidos a 20µg/ml de concentração, concanavalina A a 5 µg/ml. Os resultados mostrados são contagens médias por minuto (cpm)±DP de amostras triplicadas. Os resultados mostrados são representativos de várias experiências independentes.

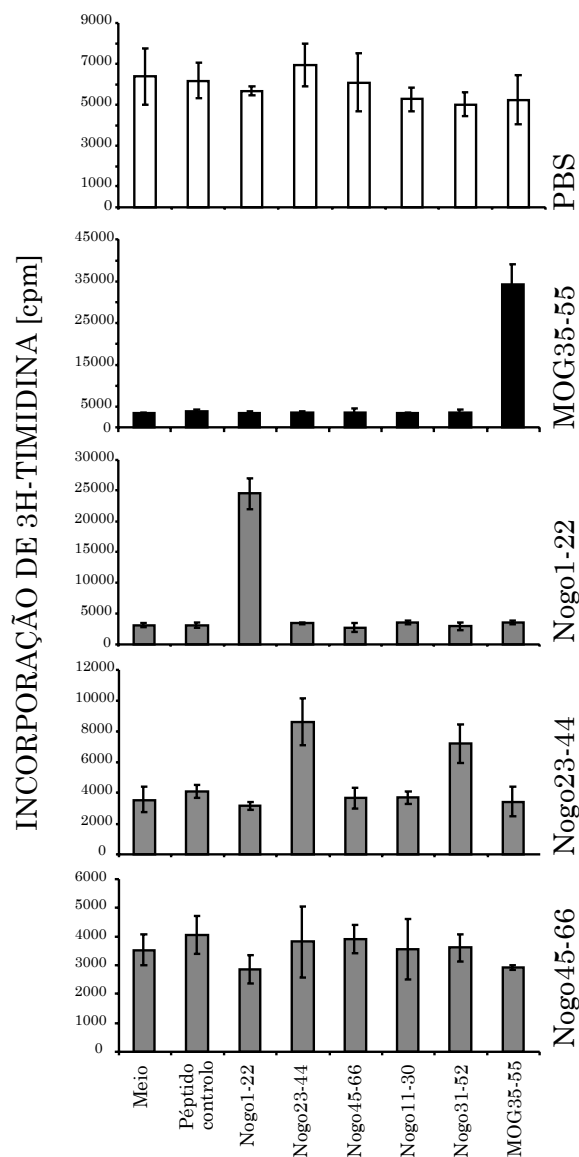






Figura 19. Indução de respostas linfocitárias T em ratinhos C57BL/6 imunizados com péptidos Nogo e MOG35-55. Trinta dias após a imunização, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados e ensaios de proliferação linfocitária estabelecidos contra um painel de péptidos, incluindo vários péptidos Nogo, MOG35-55, e péptido controlo (Vβ5.1). Todos os péptidos a 20 µg/ml, concanavalina A a 5 µg/ml, 5x10⁵ células/poço. Valores para concanavalina A não representados (PBS=122741,6±10647,3; MOG35-55=93607,6±17769,6; Nogo1-22=129698,8±4294,9; Nogo23-44=143915,4±12477; Nogo45-66=110149±17236). Os resultados mostrados são contagens médias por minuto (cpm) ±DP de amostras.

Confirmámos, posteriormente, a presença de reacções proliferativas linfocitárias em ambas as estirpes contra os péptidos Nogo acima referidos, tendo encontrado sempre resultados idênticos, e que confirmam a importância destes epítomos. Numa outra experiência, realizada com a estirpe C57BL/6, detectámos também a presença de reactividade cruzada entre linfócitos do grupo Nogo23-44 – péptido utilizado para a imunização - e o péptido Nogo31-52 (Nogo1084-1103) entretanto sintetizado, e colocado na reacção de proliferação linfocitária (Figura 19). Tal como para a estirpe SJL/J, não nos foi possível demonstrar qualquer reactividade contra os epítomos imunodominantes PLP139-151 (SJL/J) ou MOG35-55 (C57BL/6) após imunização com péptidos Nogo.

Numa fase seguinte, repetimos a tentativa de indução de respostas T, em várias estirpes diferentes de ratinho, normalmente utilizadas para estudos de autoimunidade, incluindo diversos haplotipos H-2, de forma a identificar os alelos responsáveis pelo reconhecimento de epítomos na sequência Nogo-66. Utilizámos, para esse fim, ratinhos SJL/J (H-2^s), C57BL/6 (H-2^b), Balb/c (H-2^d), B10.PL (H-2^u), B10.RIII (H-2^r), DBA/1J (H-2^a) e CBA (H-2^k); os protocolos de imunização incluíram, para além dos já testados Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66, outros péptidos sobrepostos na sequência Nogo-66. No seu conjunto, foram testadas as sequências Nogo623-640, Nogo1044-1063, Nogo1064-1083, Nogo1084-1103 e Nogo1104-1123. Os resultados dessas experiências não confirmaram a existência de reactividade em qualquer estirpe contra o péptido Nogo623-640 (à excepção da estirpe C57BL/6 numa única ocasião). No que diz respeito à sequência Nogo-66, no entanto, observou-se que em todas as estirpes testadas era possível, utilizando o referido protocolo de quebra de tolerância, encontrar reactividade linfocitária T em graus variáveis (Figura 20). As estirpes SJL/J e C57BL/6, primeiro testadas, revelaram ter, para além das já referidas reactividades, capacidade de reagir contra outros péptidos; aliás, para a estirpe C57BL/6 a proliferação contra os péptidos Nogo11-30 e 31-52 foi superior à encontrada para a sequência Nogo23-44. Nas outras estirpes testadas, foi sempre possível encontrar pelo menos um determinante

antigénico, embora os índices proliferativos fossem, normalmente, baixos. Por exemplo, nas estirpes sensíveis à EAE, como a B10.PL (H-2^u) e B10.RIII (H-2^r), detectámos reactividade contra os péptidos Nogo1044-1063 e Nogo31-52, respectivamente. A estirpe Balb/c (resistente à EAE, mas na qual se conseguem detectar linfócitos anti-MBP após imunização) evidenciou, também, reactividade contra este último antigénio. Desta forma, concluímos que a região Nogo-66 parece ser uma fonte importante de epítomos para a resposta T em várias estirpes de ratinho, com diferentes haplotipos H-2 e, provavelmente, dentro da proteína Nogo-A, é a principal região antigénica.

PÉPTIDO ESTIRPE	Nogo1044 -1063	Nogo1-22	Nogo11-30	Nogo23-44	Nogo31-52	Nogo45-66	Nogo1104 -1123
C57BL/6							
SJL/J							
CBA							
DBA							
B10.PL							
B10.RIII							
Balb/c							

Figura 20. Detecção de epítomos para a resposta linfocitária T em diferentes estirpes de ratinho. Utilizando o mesmo protocolo de imunização anteriormente descrito, testámos a presença de reactividade T contra vários péptidos derivados da sequência Nogo-66, através de ensaios de proliferação. Os resultados estão apresentados sob a forma de índice de proliferação (IP) linfocitária (proliferação antigénio-específica/proliferação sem estimulação). As diferentes gradações de cinzento representam  IP<1;  1<IP<2;  2<IP<3;  IP>3.

De forma a caracterizar a resposta linfocitária contra os péptidos Nogo utilizados para imunização nas estirpes SJL/J e C57BL/6, estudámos a sua capacidade de produção de citocinas *in vitro*, após estimulação antigénio-específica, para caracterização do seu fenótipo T_{helper} (Th). No caso da estirpe SJL/J, estabelecemos culturas de linhas celulares anti-Nogo1-22 e anti-Nogo45-66, a partir de ratinhos imunizados com estes péptidos; após quatro ciclos de proliferação, testámos a sua capacidade de produção de citocinas, após estimulação *in vitro* com péptidos Nogo, PLP139-151, péptido controlo, e estímulos não antigénio-específicos, na presença de células apresentadoras de antigénio da mesma estirpe. Os resultados desta experiência revelaram que as linhas celulares Nogo45-66 apresentavam, espontaneamente, um fenótipo Th2, caracterizado pela produção de grandes

quantidades de IL-4 e IL-10, enquanto que as linhas Nogo1-22 mostraram um fenótipo Th1, com aumento de produção de interferão gama (Figura 21). Em outros ensaios, em que testámos linfócitos periféricos nesta estirpe imediatamente após a sua purificação a partir de gânglios periféricos, conseguimos, igualmente, demonstrar a existência de linhas celulares anti-Nogo45-66 com fenótipo Th1 (dados não mostrados). No que diz respeito à estirpe C57BL/6, ensaios de produção de citocinas a partir de linfócitos isolados de gânglios linfáticos periféricos, e testados imediatamente para a produção de citocinas, revelaram que, em resposta a ambos os epítomos de linfócito T para esta estirpe (Nogo1-22 e Nogo23-44), há produção sobretudo de interferão gama, com menores quantidades de IL-4 e IL-10 (Figura 22), sendo, como tal, o fenótipo predominante Th1.

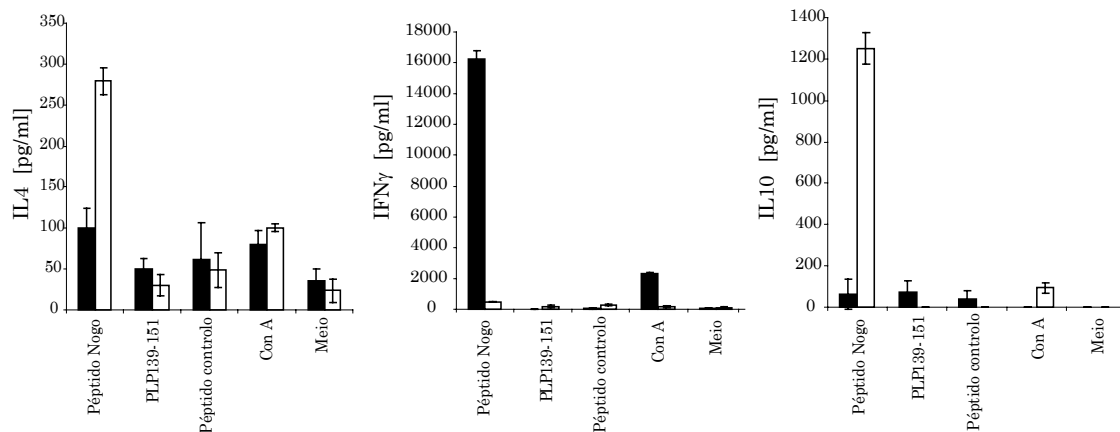


Figura 21. Ensaio de produção de citocinas em linhas celulares anti-Nogo para a estirpe SJL/J. Após imunização com péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66 em ratinhos SJL/J, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, e culturas linfocitárias estabelecidas em suspensão, com estimulação periódica com os mesmos péptidos Nogo. Após quatro ciclos de proliferação, a capacidade de secreção de citocinas das linhas celulares T foi testada após estimulação com um painel de péptidos, incluindo o péptido Nogo imunizador, PLP139-151, péptidos controlo (Vβ5.1), e concanavalina A (Con A). As linhas celulares T (■ linha Nogo1-22; □ linha Nogo45-66; 1x10⁵ linfócitos por condição) foram incubadas com APC singénicas (2.5x10⁶/ml), e os sobrenadantes colhidos após 48 horas, sendo testada a presença de citocinas por método ELISA. Todos os péptidos a 10µg/ml, Con A a 2.5µg/ml. Os resultados mostrados representam a média ± DP de amostras triplicadas.

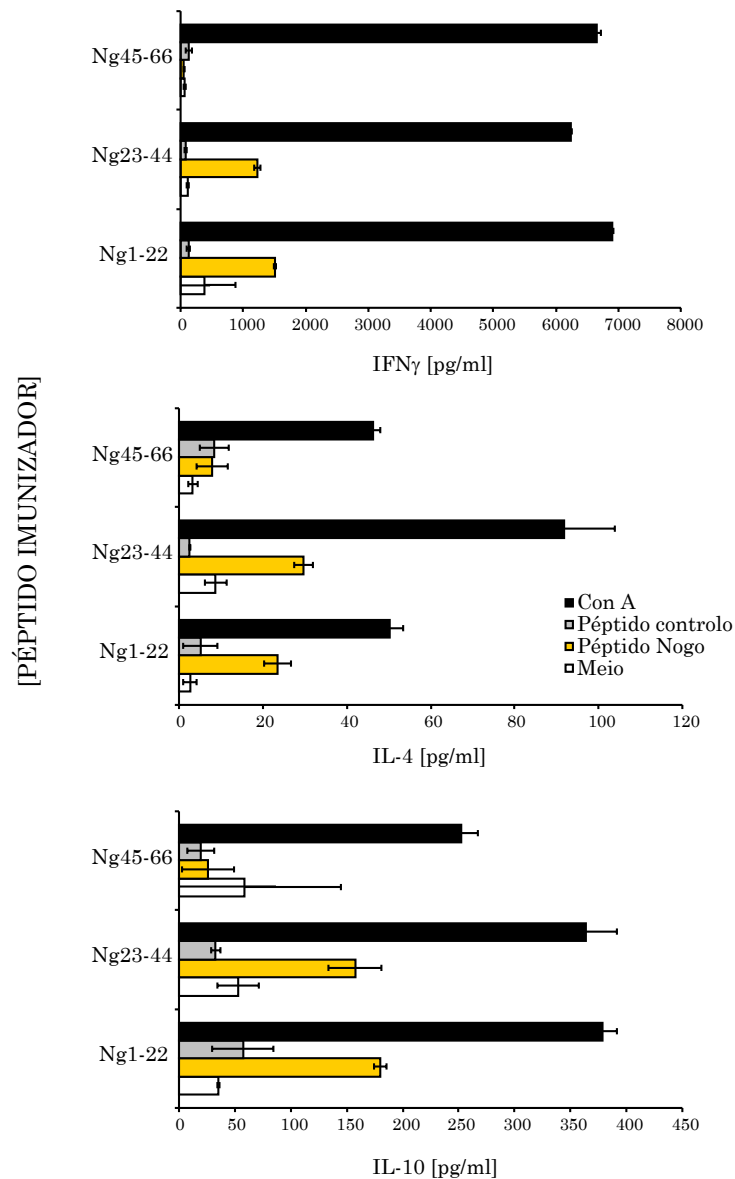


Figura 24. Ensaio de produção de citocinas a partir de linfócitos periféricos de ratinhos C57BL/6 imunizados com péptidos Nogo (1-22, 23-44, 45-66). Após o final da experiência, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados e ensaios de produção de citocinas estabelecidos com linfócitos totais ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) após estimulação com um painel de péptidos, incluindo o péptido Nogo imunizador, MBP85-99, péptidos controlo (V β 5.1), e concanavalina A (Con A). Os sobrenadantes foram colhidos após 48 horas, sendo testada a presença de citocinas por método ELISA. Todos os péptidos a $10\mu\text{g}/\text{ml}$, Con A a $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$. Os resultados mostrados representam a média \pm DP de amostras triplicadas.

Em comparação com os estudos realizados em linhas celulares na estirpe SJL/J, em que se assistiu a uma polarização clara do fenótipo Th, nos ensaios realizados a partir de linfócitos obtidos directamente a partir

dos animais não se observou uma diferenciação tão nítida. Naturalmente, numa linha celular estabelecida e mantida em cultura, a partir de alguns ciclos de proliferação na presença de péptido e APC quase todos os clones linfocitários irão estabelecer um determinado fenótipo baseado nas condições de apresentação de antígeno, incluindo os co-estímulos, citocinas segregadas pelas APC, e, possivelmente, devido à natureza do próprio antígeno. Tal irá resultar em perfis de secreção de citocinas mais bem definidos, ou em melhor polarização. É importante salientar que na experiência realizada com linhas celulares anti-Nogo (Figura 21), não foi colocado qualquer estímulo de diferenciação Th1 ou Th2 no meio de cultura, pelo que os fenótipos apresentados por estas linhas celulares foram espontaneamente desenvolvidos.

6. Indução de respostas linfocitárias B contra péptidos da sequência Nogo-66 e demonstração de diversificação de epítomos para outros antígenos de mielina.

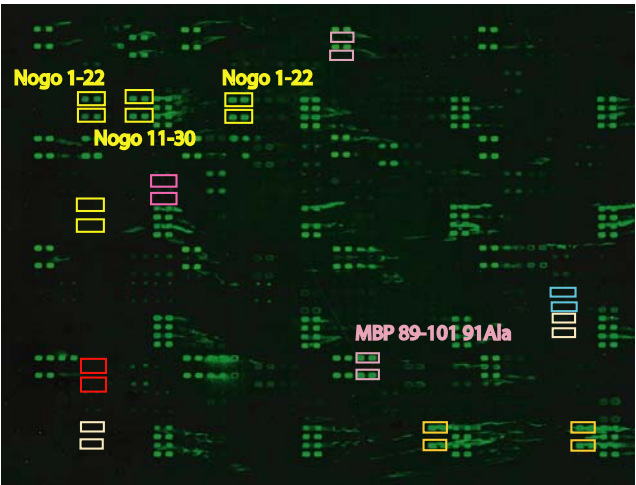
De maneira a seguir a indução de uma resposta de anticorpos específica contra os péptidos Nogo utilizados na imunização, e a possível diversificação de epítomos para outros antígenos presentes na mielina do SNC, utilizámos a mesma tecnologia de *protein microarrays* mencionada no capítulo anterior, e que permite a análise múltipla da presença de anticorpos contra vários alvos antigénicos simultaneamente. Como anteriormente, utilizámos *arrays* com 2304 pontos, representando mais de 250 antígenos distintos. Estes incluem várias proteínas da mielina, e péptidos de sequência sobreposta, representando vários alvos antigénicos importantes na EAE. Para estes estudos, adicionámos vários péptidos Nogo aos *arrays*, tais como Nogo623-640, Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66, Nogo1064-1083 e Nogo1084-1103. Soro de ratinhos SJL/J e C57BL/6, imunizados com os diferentes péptidos Nogo, foi obtido em diversas alturas pós-imunização e testado para a presença de anticorpos anti-mielina detectados com *arrays* de antígenos de mielina, por comparação com soro

pré-imunização de animais da mesma estirpe, bem como com soro pós-imunização de animais imunizados com PBS em adjuvante completo de FREUND. A avaliação da imagem de fluorescência emitida após visualização de *arrays* individuais, testados com o soro de um único animal experimental, demonstrou que, após imunização com cada um dos péptidos Nogo-66, anticorpos específicos contra o antígeno indutor são detectáveis em ambas as estirpes, revelados pela presença de marcação fluorescente na região dos *arrays* que contém os péptidos Nogo, e que não existem nos animais não imunizados (Figura 23A-C, áreas assinaladas, e tabela anexa; exemplo para um ratinho SJL/J imunizado com Nogo1-22 e Nogo45-66). Como se pode observar na figura, encontrámos, igualmente, a presença de reactividade contra vários outros antígenos de mielina presentes nos *arrays* (Figura 23A-C, áreas assinaladas) para além do antígeno Nogo utilizado para imunização, correspondendo ao fenómeno de diversificação da resposta de anticorpos contra outros epítomos, tal como já tinha sido por nós descrito no modelo de EAE crónica em ratinhos SJL/J (26).

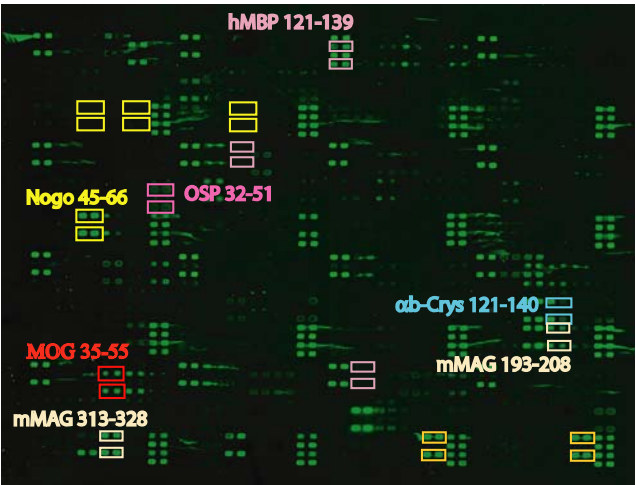
Para melhor estudar o fenómeno de diversificação de epítomos, procedemos à imunização de ratinhos SJL/J e C57BL/6 com emulsões dos péptidos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66 em ACF, e seguimos a sua resposta linfocitária B ao longo do tempo utilizando a mesma tecnologia, começando com soro pré-imune, e fazendo colheitas ao fim de períodos de tempo determinados. Para a estirpe SJL/J, comparámos, igualmente, a evolução da resposta de anticorpos com a de animais imunizados com o péptido PLP139-151 em ACF, e controlos imunizados apenas com ACF, de forma a poder excluir efeitos não-antígeno específicos da imunização. A avaliação de mapas de reactividade total, *i.e.*, sem fazer qualquer eliminação de antígenos baseada em critérios estatísticos, para ambas as estirpes, mostrou que, após imunização com os péptidos Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66, e PLP139-151 (para a estirpe SJL/J) há diferenças evidentes no padrão de reactividade, consistentes com a individualidade da reacção imune contra estes antígenos (Figura 24 e 25).



A Soro ratinho SJL/J normal



B Imunização com Nogo1-22



C Imunização com Nogo45-66

Antígeno alvo	A	B	C
abCrys 121-140	138.435	124.704	2776.84
hMBP 121-139	32.0301	-31.176	4724.6
MBP 89-101 91Ala	217.153	5988.79	159.739
mMAG 193-208	119.434	68.8886	3573.96
mMAG 313-328	40.1734	59.8376	11849.5
MOG 35-55	214.982	440.485	4557.01
mOSP 32-51	-113.46	-110.12	990.904
Nogo 11-30	9.7719	4054.88	74.3702
Nogo 1-22	-16.286	6481.57	52.8971
Nogo 45-66	-10.858	-25.645	30790.3
anti-mouse IgG/M	60000	60000	60000

Figura23A-C. Caracterização da resposta linfocitária B autorreativa após imunização com péptidos Nogo através de *microarrays* de proteínas. *Microarrays* individuais foram incubados com soro (diluição 1:150) de ratinhos SJL/J individuais, normal pré-imune (A), e 60 dias após imunização com os péptidos Nogo1-22 (B) e Nogo45-66 (C), e a presença de anticorpos anti-mielina detectados por anticorpo secundário fluorescente. A maioria dos pontos fluorescentes observados é marcadora de orientação; estão assinalados pontos de elevada fluorescência correspondendo à presença de anticorpos contra antígenos de mielina (Nogo, MBP, OSP, MOG, MAG, α -B cristalina) e controlo positivo (anti-IgG/M). D – Quantificação das intensidades de fluorescência dos pontos assinalados nestes três *arrays* individuais em formato de tabela.

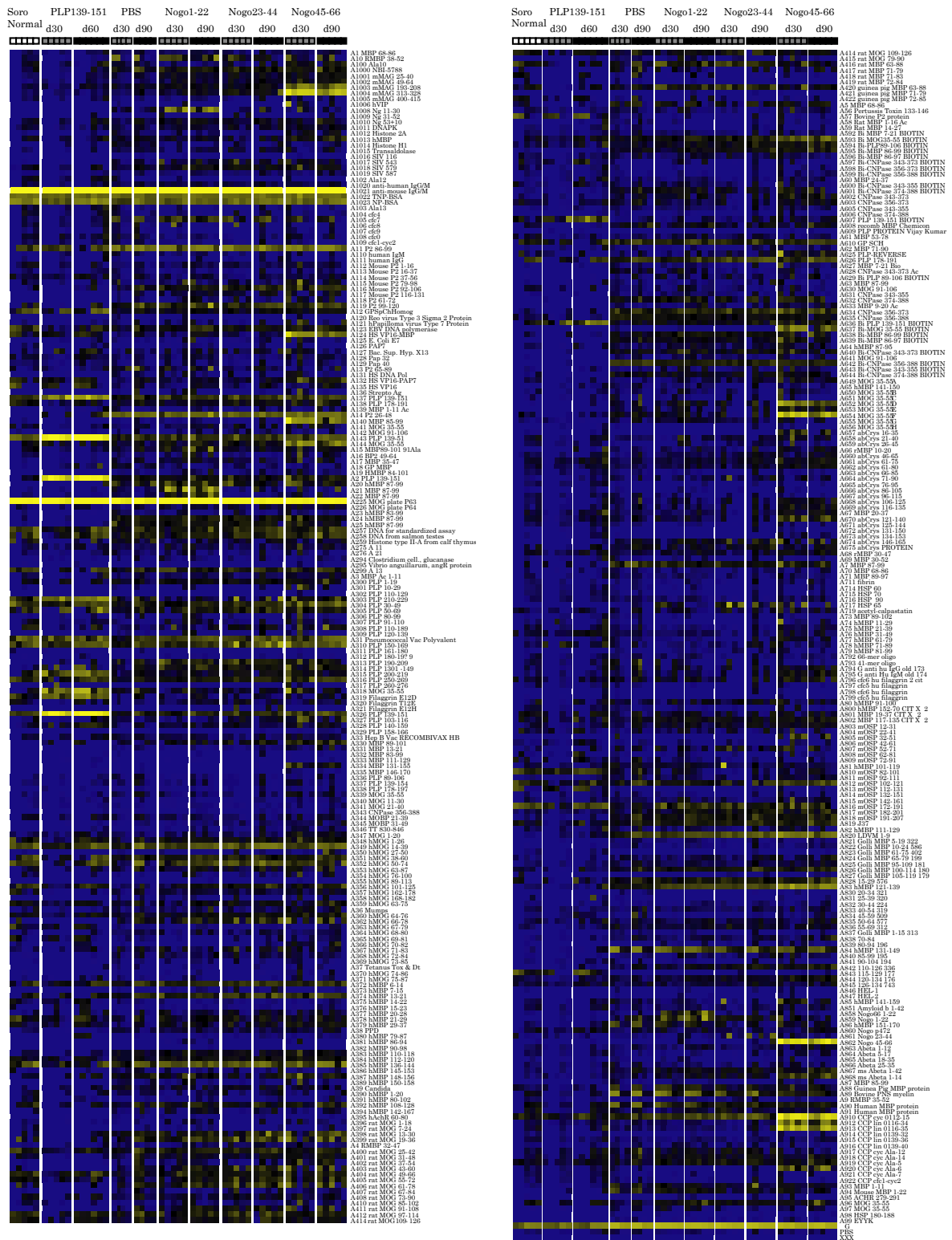


Figura 24. Mapas de reactividade total representando a presença de anticorpos anti-proteínas e péptidos de mielina em ratinhos SJL/J imunizados com péptidos Nogo (1-22, 23-44, 45-66), PLP139-151 em ACF, PBS em ACF, e soro normal pré-imune. Representados os resultados 30 (d30) e 90 (d90) após imunização para os péptidos Nogo e PBS, e 30 (d30) e 60 (d60) para PLP139-151. Cada coluna representa os resultados de um animal individual para um *array* (n=5 para todos os grupos, excepto n=4 para PBS),

e cada fila um péptido ou proteína de mielina presente no *array*. A intensidade de fluorescência encontra-se representada numa escala de cor desde o azul escuro (negativo), passando pelo preto (limiar inferior de detecção) até graus progressivamente mais intensos de amarelo (positivo).

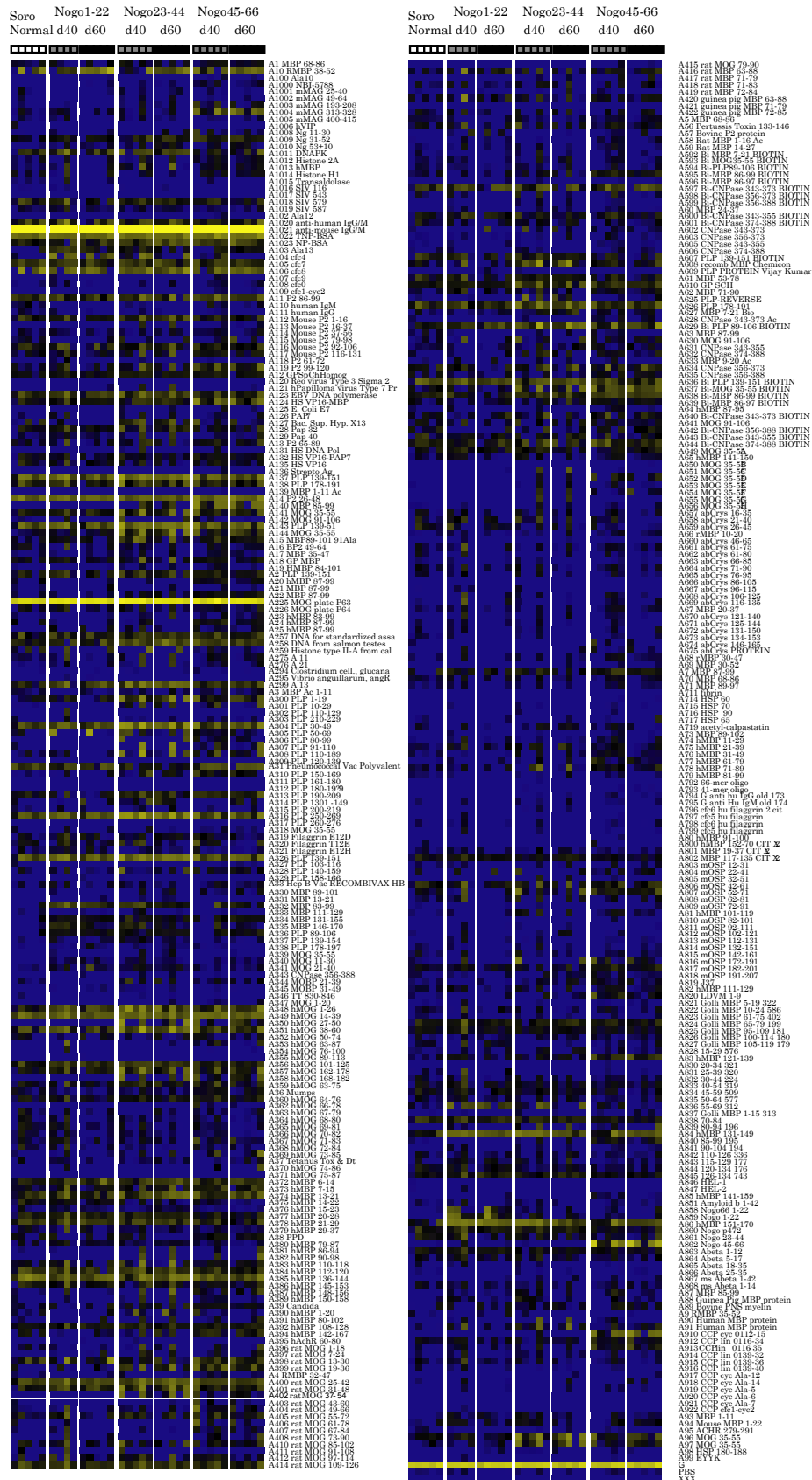


Figura 25. Mapas de reactividade total representando a presença de anticorpos anti-proteínas e péptidos de mielina em ratinhos C57BL/6 imunizados com péptidos Nogo (1-22, 23-44, 45-66), e soro normal pré-imune. Representados os resultados 40 (d40) e 60 (d60) após imunização com os péptidos Nogo. Cada coluna representa os resultados de um animal individual para um *array* (n=5 para todos os grupos, excepto n=4 para Nogo1-22 d40), e cada fila um péptido ou proteína de mielina presente no *array*. A intensidade de fluorescência encontra-se representada tal como na figura anterior.

Estas diferenças de reactividade podem ser apreciadas com base na inspecção visual dos mapas de reactividade total, mas, como se torna imediatamente aparente, é difícil avaliar, de forma correcta, diferenças de reactividade presentes entre os diferentes grupos, dada a quantidade de informação presente (quer em número de péptidos, quer de grupos de experiência); para alguns alvos antigénicos, em que a reactividade é evidentemente muito elevada, é possível fazer um julgamento de presença-ausência, mas, para a maioria, em que os valores de fluorescência são médios-baixos, ou médios-altos, e em que existe variabilidade entre animais individuais, é praticamente impossível fazer julgamentos sem enviesamento. Grosseiramente, é possível observar que após a indução de EAE com PLP139-151 em ratinhos SJL/J, e como seria de esperar, surgem valores elevados de reactividade contra este péptido, bem como contra outros péptidos da PLP (*e.g.* p150-169, p200-219, p210-229, diversificação intramolecular), e contra péptidos em outras proteínas de mielina (*e.g.* MOG35-55, diversificação intermolecular). A imunização com PBS e ACF, sem péptido, não induz qualquer resposta específica de alta reactividade contra péptidos da mielina do SNC, sendo apenas aparentes valores baixos, e transversalmente pouco coerentes de fluorescência contra alguns antigénios, tais como componentes da mielina do nervo periférico como a proteína P2.

No que diz respeito aos péptidos Nogo, surgem reactividades muito evidentes contra alguns alvos antigénicos; de uma forma geral, no entanto, os valores de reactividade são sempre mais baixos para a estirpe C57BL/6, sendo a resposta de anticorpos mais potente na estirpe SJL/J. Para a Nogo1-22, na estirpe SJL/J, existe reactividade contra o péptido imunizador (Nogo1-22) bem como contra o péptido Nogo11-30 (Nogo1064-1080), o que poderá significar que o epítopo B para este antigénio se encontra na região

carboxi-terminal; existe, igualmente, reactividade contra a MBP87-99, e hMBP136-144. Para a estirpe C57BL/6, com o mesmo péptido Nogo1-22, é detectável fluorescência contra os péptidos hMBP131-149 e 151-170, para além do péptido imunizador. No que diz respeito ao péptido Nogo23-44, na estirpe SJL/J e C57BL/6, a resposta linfocitária B é mais fraca, o que é apreciável até pela baixa reactividade contra o próprio antígeno imunizador. Existe alguma diversificação de epítomos, igualmente de baixa intensidade, sobretudo contra alguns péptidos na MOG (p1-26 na estirpe C57BL/6, p14-39 em ambas estirpes, p50-74 na estirpe SJL/J) e PLP (p1-19 na estirpe C57BL/6). O péptido Nogo45-66 parece ser o mais antigénico de todos os péptidos Nogo, quando avaliado através deste método. Em ambas as estirpes, a imunização com Nogo45-66 induz uma resposta de anticorpos muito potente, não só contra este péptido, mas também contra numerosos outros alvos. Para além da reactividade, de fluorescência muito elevada e consistente, contra a Nogo45-66, são também muito evidentes reactividades contra a proteína MAG (p193-208 e 313-328 na estirpe SJL/J, p313-328 para a estirpe C57BL/6), MBP (p85-99, hMBP121-139 na estirpe SJL/J, hMBP131-149 na estirpe C57BL/6), e MOG (p35-55 na estirpe SJL/J).

De maneira seleccionar apenas as reactividades estatisticamente relevantes, socorremo-nos de programas de análise estatística (*Statistical Analysis of Microarrays- SAM*) e de agrupamento (*Cluster* e *Treeview*). Inicialmente, comparámos a reactividade dos grupos imunizados com péptidos de mielina com o grupo imunizado com PBS em ACF, de forma a eliminar as reactividades que pudessem ser devidas a reacção cruzada contra antígenos presentes na emulsão de ACF, e que não fossem devidas à resposta imune específica contra os péptidos utilizados na imunização. Tal processo levou, por exemplo, à eliminação de reactividades contra antígenos da mielina de nervo periférico, bem como à detecção de reactividades de baixo valor contra epítomos imunodominantes, como sendo a PLP139-151 na estirpe SJL/J. A presença de baixos valores de fluorescência contra este epítopo após imunização com ACF, não significa, naturalmente, que não possam existir títulos mais elevados após imunização antígeno-específica,

por exemplo, com o mesmo péptido (como se torna evidente, também, a partir da análise dos mapas de reactividade geral). Numa fase seguinte, utilizando o programa de análise estatística SAM, seleccionámos apenas as reactividades que possuísem um aumento proporcional superior a cinco vezes a reactividade pré-imune para a mesma estirpe, um valor de fluorescência de base acima de 300 unidades, e um valor de significância estatística elevado (valor de significância q (%) inferior a 5 para a estirpe SJL/J e 10 para a estirpe C57BL/6^f).

A apreciação dos resultados da reactividade média, e aumento proporcional em relação ao estado pré-imune para cada estirpe (Figuras 26 e 27), permite confirmar a existência de reactividade significativa contra alguns dos antígenos previamente identificados visualmente nos mapas de reactividade geral, negar outros, e revelou, igualmente, vários outros antígenos importantes que não eram evidentes anteriormente. Para alguns antígenos, existe uma variação ao longo do tempo, com reactividade significativa apenas em um dos dois momentos de avaliação pós-imunização, enquanto que, para outros, esta mantém-se sempre positiva.

Na estirpe SJL/J, tal como anteriormente comentado, os valores de reactividade são normalmente mais elevados (valores de fluorescência média de 27098.30 para Nogo45-66, 18356.10 para mMAG313-328 em ratinhos SJL/J imunizados com Nogo45-66, contra 6042.20 para Nogo45-66 e 1694.10 para mMAG313-328 na estirpe C57BL/6 – Figura 26 e 27). Para ratinhos SJL/J imunizados com péptidos Nogo, surgem vários alvos com reactividades importantes (Figura 26): PLP10-19 de forma transitória em resposta à imunização com Nogo45-66; PLP190-209 de forma persistente e valores baixos em todos os grupos; MBP85-99 de forma persistente e valores elevados no grupo Nogo45-66; hMBP121-139 e 141-159 de forma persistente em todos os grupos; mMAG313-328 em todos os grupos, mas com valores de reactividade relevantes, sobretudo, no grupo Nogo45-66 (onde é o segundo antígeno com maior reactividade, logo a seguir ao próprio antígeno

^f A diferença do limiar de significância estatística escolhido reflecte, também, os valores de reactividade mais baixos, em média, para a estirpe C57BL/6.

imunizador); MOG35-55, igualmente de forma preponderante no grupo Nogo45-66 (terceiro antígeno em nível de reatividade) e 43-60. Surpreendentemente, mesmo antígenos *minor* como o α -B cristalina121-140 e 16-35, mOSP32-51, A β 1-14 (parte da sequência amiloidogénica A β 1-42), e CNPase 343-373 surgem também no grupo Nogo45-66, ilustrando a enorme diversificação de epítomos encontrada após imunização com este péptido.

Péptido	Normal	Nogo1-22	Nogo1-22	Nogo23-44	Nogo23-44	Nogo45-66	Nogo45-66	Normal	Nogo1-22	Nogo1-22	Nogo23-44	Nogo23-44	Nogo45-66	Nogo45-66	
	d30	d90	d30	d90	d30	d90	d30	d30	d90	d30	d90	d30	d90	d30	d90
PLP10-29	-59,60	12,60	8,30	-39,00	-22,00	851,10	26,70	1,00	-0,21	-0,14	0,65	0,37	-14,28	-0,45	
PLP103-116	-257,40	38,70	46,10	119,50	126,90	845,40	423,80	1,00	-0,15	-0,18	-0,46	-0,49	-3,28	-1,65	
PLP139-151	94,50	250,80	489,80	437,40	269,50	1060,20	434,00	1,00	2,65	5,18	4,63	2,85	11,22	4,59	
PLP190-209	-222,50	981,30	507,30	916,40	521,40	546,40	267,20	1,00	-4,41	-2,28	-4,12	-2,34	-2,46	-1,20	
PLP-REVERSE	87,70	26,50	149,90	90,10	137,30	2084,90	326,50	1,00	0,30	1,71	1,03	1,57	23,77	3,72	
MBP35-47	-160,60	131,50	162,30	109,40	63,00	348,20	213,80	1,00	-0,82	-1,01	-0,68	-0,39	-2,17	-1,33	
hMBP61-79	-218,50	12,90	21,10	-14,40	65,20	300,70	88,80	1,00	-0,06	-0,10	0,07	-0,30	-1,38	-0,41	
MBP85-99	-178,70	12,70	21,00	-8,70	21,20	9981,20	2525,50	1,00	-0,07	-0,12	0,05	-0,12	-55,85	-14,13	
MBP87-99	-258,50	5160,90	3806,30	5,40	181,40	164,30	226,40	1,00	-19,96	-14,72	-0,02	-0,70	-0,64	-0,88	
MBP89-101	-184,50	182,10	262,10	268,00	325,50	390,20	792,50	1,00	-0,99	-1,42	-1,45	-1,76	-2,11	-4,30	
hMBP121-139	-212,70	1011,10	1121,20	1028,70	1268,80	5146,90	3874,20	1,00	-4,75	-5,27	-4,84	-5,97	-24,20	-18,21	
hMBP131-149	-120,80	1827,90	1805,50	979,00	1366,80	1030,10	1360,30	1,00	-15,13	-14,95	-8,10	-11,31	-8,53	-11,26	
MBP131-155	-85,50	-2,70	-4,60	-0,70	4,40	731,60	280,80	1,00	0,03	0,05	0,01	-0,05	-8,56	-3,28	
hMBP141-159	-95,90	52,50	35,30	814,40	-3,20	780,70	112,40	1,00	-0,55	-0,37	-8,49	0,03	-8,14	-1,17	
VP16-MBP	430,70	69,10	181,10	66,40	69,30	9413,60	2497,70	1,00	0,16	0,42	0,15	0,16	21,86	5,80	
mMAG193-208	52,70	221,80	249,20	212,10	242,30	3147,90	2742,20	1,00	4,21	4,73	4,02	4,60	59,73	52,03	
mMAG313-328	11,70	136,00	173,10	357,70	732,90	18356,10	9017,90	1,00	11,62	14,79	30,57	62,64	1568,90	770,76	
MOG35-55	63,90	253,10	178,90	139,90	146,40	15506,50	6456,50	1,00	3,96	2,80	2,19	2,29	242,67	101,04	
MOG35-55	32,50	315,40	532,70	450,50	600,90	1651,20	1880,60	1,00	9,70	16,39	13,86	18,49	50,81	57,86	
rMOG37-54	-167,80	90,00	49,60	45,20	45,30	434,60	242,40	1,00	-0,54	-0,30	-0,27	-0,27	-2,59	-1,44	
rMOG43-60	-5,80	247,40	422,20	773,80	781,60	670,80	988,60	1,00	-42,66	-72,79	-133,41	-134,76	-115,66	-170,45	
hMOG70-82	-70,90	-55,40	-51,90	-31,00	-30,30	450,70	170,70	1,00	0,78	0,73	0,44	0,43	-6,36	-2,41	
abCrys16-35	-237,20	-44,70	-54,10	-55,00	-66,00	860,10	297,00	1,00	0,19	0,23	0,23	0,28	-3,63	-1,25	
abCrys121-140	66,40	109,80	103,60	37,60	64,40	1275,60	845,10	1,00	1,65	1,56	0,57	0,97	19,21	12,73	
abCrys116-135	-120,30	75,10	77,60	35,30	78,20	267,30	307,70	1,00	-0,62	-0,65	-0,29	-0,65	-2,22	-2,56	
mOSP32-51	-270,70	-113,50	-116,60	-98,50	-133,70	1021,60	329,40	1,00	0,42	0,43	0,36	0,49	-3,77	-1,22	
msAbeta1-14	-68,70	125,50	190,40	197,50	156,00	988,40	1036,30	1,00	-1,83	-2,77	-2,87	-2,27	-14,39	-15,08	
CNPase343-373	11,40	149,90	229,60	64,40	152,00	393,00	382,10	1,00	13,15	20,14	5,65	13,33	34,47	33,52	
LDVM1-9	-82,80	908,30	1333,60	1383,30	1740,40	2550,90	2557,80	1,00	-10,98	-16,11	-16,71	-21,02	-30,81	-30,89	
Nogo1-22	-206,30	972,50	2458,20	342,50	385,90	447,60	6,20	1,00	-4,71	-11,92	-1,66	-1,87	-2,17	-0,03	
Nogo11-30	-286,40	3079,00	3150,40	22,00	161,30	381,80	-86,10	1,00	-10,75	-11,00	-0,08	-0,56	-1,33	0,30	
Nogo23-44	54,90	31,60	24,30	728,70	1056,20	118,80	7,90	1,00	0,58	0,44	13,27	19,24	2,16	0,14	
Nogo31-52	-393,40	-13,50	-122,70	77,30	-156,40	-85,60	-144,00	1,00	0,03	0,31	-0,20	0,40	0,22	0,37	
Nogo45-66	-81,80	9,70	-16,80	-24,10	85,90	27098,30	18432,70	1,00	-0,12	0,21	0,29	-1,05	-331,28	-225,34	
Fluorescência								Aumento							
								proporcional							

Fluorescência

Aumento proporcional

Figura 26. Lista de péptidos com anticorpos anti-mielina detectados por *myelin spotted arrays* no dia 30 e 90 após imunização de ratinhos SJL/J com péptidos Nogo (1-22, 23-44, 45-66). Mostrados apenas os alvos antigénicos com reatividade (fluorescência) absoluta acima de 300 unidades, aumento proporcional contra o controlo normal pré-imune superior a 5 vezes, e significância estatística (SAM valor $q < 0.05$). Para cada péptido são dados os valores de reatividade média de 5 ratinhos pré-imunização (normal), 30 e 90 dias pós-imunização, e o valor do aumento proporcional médio sobre o controlo. Representados também os resultados para outros péptidos da sequência Nogo-66, mesmo na ausência de cumprimento dos critérios anteriores. Todos os péptidos correspondem à sequência no ratinho, a não ser quando indicado. h – humano; r – rato; m – ratinho.

É importante recordar que, após imunização com péptidos Nogo na estirpe SJL/J, detectámos uma resposta linfocitária T importante contra as sequências Nogo1-22 e Nogo45-66, e que correspondem, também, àquelas capazes de estimular uma resposta B mais significativa, com valores elevados de reactividade para anticorpos contra cada um dos antigénios imunizantes (fluorescência média de 3079,0 para Nogo1-22 e 27098,30 para Nogo45-66). O péptido Nogo23-44, que não parece conter um epítipo T para a estirpe SJL/J, é capaz de induzir anticorpos contra si mesmo, embora em valores baixos de reactividade (fluorescência média 728,70), e evidencia o menor grau de diversificação da resposta, que é, sobretudo, contra antigénios que também apresentam respostas a partir dos outros dois antigénios Nogo (*i.e.*, não parece existir um padrão de diversificação “próprio” para este antigénio, de acordo com o seu carácter *minor* nesta estirpe de ratinho).

Para a estirpe C57BL/6 (Figura 27), a lista de antigénios com reactividades importantes é também muito significativa, e representa uma provável manifestação do mesmo fenómeno de diversificação: PLP1-19 de forma persistente no grupo Nogo23-44 e transitória no grupo Nogo45-66; MBP83-99 de forma persistente em todos os grupos, mas sobretudo no grupo Nogo1-22; MBP85-99 e MBP121-138 no grupo Nogo45-66; MBP151-170 nos grupos Nogo1-22 e 23-44; MAG313-328 no grupo Nogo45-66; MOG1-26, 19-36, 27-50, 35-55 e OSP52-71 todos sobretudo no grupo Nogo23-44. Aliás, nesta estirpe, ao contrário da SJL/J, para além do péptido Nogo45-66, a sequência 23-44 é, também, um importante antigénio para a resposta linfocitária B. É, igualmente, interessante verificar que nesta estirpe o péptido Nogo45-66 é capaz de induzir uma forte resposta de anticorpos (fluorescência média 6042,20), com um padrão de diversificação de epítipos próprio (e, curiosamente, muito semelhante ao da estirpe SJL/J, com reactividade secundária predominante contra MAG313-328 e MBP85-99), apesar de não ser um epítipo para a resposta linfocitária T, implicando que poderá actuar de forma T-independente. Para o péptido Nogo1-22, após imunização encontrámos uma boa resposta linfocitária T, tal como

anteriormente descrito, e uma resposta de anticorpos significativa, mas não muito elevada (fluorescência média 1556,38). No que diz respeito à sequência Nogo23-44, a partir da qual a resposta de anticorpos sofre uma diversificação vasta, embora de baixa intensidade, não existe reactividade significativa contra o péptido imunizador, mas sim contra a sequência 31-52 (Nogo1084-1103; fluorescência média 536,40); tal como demonstrámos na secção anterior, após imunização com Nogo23-44 nesta estirpe, são detectáveis respostas linfocitárias T não só contra este péptido, mas também contra o péptido Nogo31-52, o que é consistente com o facto provável de que o epítipo nesta região se localizar no seu *terminus* carboxi. Tal explicaria também a baixa capacidade proliferativa linfocitária encontrada após imunização com Nogo23-44, e a baixa reactividade da resposta linfocitária: a sequência Nogo23-44 poderá não corresponder necessariamente à melhor escolha para englobar o epítipo da estirpe C57BL/6. Como vimos, a sequência Nogo31-52 é, por si mesma, um antigénio T com capacidade de induzir fortes respostas proliferativas nesta, e noutras estirpes, inclusivamente de maior intensidade que a Nogo23-44.

Péptido	Normal	Nogo1-22	Nogo1-22	Nogo23-44	Nogo23-44	Nogo45-66	Nogo45-66	Normal	Nogo1-22	Nogo1-22	Nogo23-44	Nogo23-44	Nogo45-66	Nogo45-66
		d40	d60	d40	d60	d40	d60		d40	d60	d40	d60	d40	d60
PLP1-19	188,20	356,88	175,40	2057,80	2138,40	786,50	1022,20	1,00	1,90	0,93	10,93	11,36	4,18	5,43
PLP89-106	51,00	272,50	296,20	273,40	258,90	145,30	343,50	1,00	5,34	5,81	5,36	5,08	2,85	6,74
PLP150-169	-3,30	29,13	32,70	396,00	199,60	487,90	294,40	1,00	-8,83	-9,91	-120,00	-60,48	-147,85	-89,21
hMBP7-15	134,30	738,50	206,50	356,80	652,00	634,40	507,20	1,00	5,50	1,54	2,66	4,85	4,72	3,78
MBP83-99	68,60	1469,88	757,20	1000,20	431,80	397,50	365,60	1,00	21,43	11,04	14,58	6,29	5,79	5,33
MBP85-99	-136,80	-330,63	-301,70	220,70	94,00	2364,90	1906,40	1,00	2,42	2,21	-1,61	-0,69	-17,29	-13,94
MBP87-99	-0,90	-20,38	-104,90	72,50	122,90	315,90	324,60	1,00	22,64	116,56	-80,56	-136,56	-351,00	-360,67
hMBP121-139	45,40	260,38	60,20	164,00	174,30	725,00	874,10	1,00	5,74	1,33	3,61	3,84	15,97	19,25
hMBP131-149	563,90	2532,50	1780,20	2992,50	1410,70	1272,50	1661,60	1,00	4,49	3,16	5,31	2,50	2,26	2,95
MBP131-155	42,20	255,13	240,00	309,70	249,00	206,10	370,80	1,00	6,05	5,69	7,34	5,90	4,88	8,79
MBP146-170	-25,20	589,88	189,80	529,70	136,90	158,20	59,10	1,00	-23,41	-7,53	-21,02	-5,43	-6,28	-2,35
hMBP151-170	491,20	3395,38	2633,00	2991,60	1430,50	1323,40	1207,70	1,00	6,91	5,36	6,09	2,91	2,69	2,46
mMAG313-328	101,80	90,63	16,90	91,30	26,10	1694,10	2081,30	1,00	0,89	0,17	0,90	0,26	16,64	20,44
hMOG1-26	434,80	1518,75	1007,60	2964,00	2015,30	1095,50	1546,60	1,00	3,49	2,32	6,82	4,64	2,52	3,56
rMOG19-36	-0,50	93,38	2,30	804,80	885,20	1414,00	857,00	1,00	-186,75	-4,60	-1609,60	-1770,40	-2828,00	-1714,00
hMOG27-50	-118,30	-244,00	-272,20	1397,20	1073,70	477,50	538,60	1,00	2,06	2,30	-11,81	-9,08	-4,04	-4,55
MOG35-55	96,90	197,00	160,90	2044,70	1987,50	700,30	896,10	1,00	2,03	1,66	21,10	20,51	7,23	9,25
hMOG63-87	-102,10	543,13	-132,90	-103,00	-202,70	209,40	133,20	1,00	-5,32	1,30	1,01	1,99	-2,05	-1,30
hMOG162-178	317,70	727,25	391,50	2131,50	1175,60	707,70	1113,50	1,00	2,29	1,23	6,71	3,70	2,23	3,50
mOSP52-71	152,30	373,25	-172,10	842,20	429,80	540,30	597,40	1,00	2,45	-1,13	5,53	2,82	3,55	3,92
Nogo1-22	-106,60	1556,38	1377,00	149,00	-11,70	14,60	-9,60	1,00	-14,60	-12,92	-1,40	0,11	-0,14	0,09
Nogo11-30	-37,70	-88,63	-179,30	-325,90	-137,50	264,20	46,80	1,00	2,35	4,76	8,64	3,65	-7,01	-1,24
Nogo23-44	330,50	702,00	125,90	264,70	206,00	160,20	307,80	1,00	2,12	0,38	0,80	0,62	0,48	0,93
Nogo31-52	181,70	384,88	275,80	536,40	577,30	668,50	635,60	1,00	2,12	1,52	2,95	3,18	3,68	3,50
Nogo45-66	-135,90	-54,00	-238,80	-195,20	-359,50	6042,20	6412,10	1,00	0,40	1,76	1,44	2,65	-44,46	-47,18

Fluorescência

Aumento proporcional

Figura 27. Lista de péptidos com anticorpos anti-mielina detectados por *myelin spotted arrays* no dia 40 e 60 após imunização de ratinhos C57BL/6 com péptidos Nogo (1-22, 23-44, 45-66). Mostrados apenas os alvos antigénicos com reactividade (fluorescência) absoluta acima de 300 unidades, aumento proporcional contra o controlo normal pré-imune superior a 5 vezes, e significância estatística (SAM valor $q < 0.1$). Para cada péptido são dados os valores de reactividade média de 5 ratinhos pré-imunização, 40 e 60 dias pós-imunização, e o valor do aumento proporcional médio sobre o controlo. Representados também os resultados para outros péptidos da sequência Nogo-66, mesmo na

ausência de cumprimento dos critérios anteriores. Todos os péptidos correspondem à sequência no ratinho, a não ser quando indicado. h – humano; r – rato; m – ratinho.

Com base nos resultados anteriores, tentámos restringir ainda mais os critérios de selecção de alvos antigénicos para a resposta B, utilizando não só os referidos programas de análise estatística, mas também de agrupamento (*clustering*). Desta forma, tentámos eliminar antígenos que não apresentem reactividade de forma consistente entre animais experimentais, ou seja, para os quais o desvio padrão da sua fluorescência média seja demasiado elevado. Os resultados desta análise final (Figura 28A-D), apresentados sobre a forma de mapa de reactividade com os agrupamentos de animais e péptidos representados, mostram que, para a estirpe SJL/J, os grupos experimentais segregam-se em agrupamentos discretos, sem sobreposição entre si; isto é particularmente evidente para o grupo Nogo45-66, que se isola de todos os outros precocemente, seguido de um agrupamento contendo todos os animais de controlo e outro contendo os grupos Nogo1-22 e Nogo23-44, que, por sua vez, se irão segregar mais tardiamente um do outro, e de forma menos clara. Para a estirpe C57BL/6, o processo de agrupamento é menos claro; há uma separação inicial de alguns animais do grupo Nogo45-66 (4 do total de 5), o que é consistente com a individualidade deste antígeno; separam-se, de seguida, um grupo contendo a maioria dos animais de controlo (4/5), outro com a maioria dos animais imunizados com Nogo23-44 (4/5), e um terceiro grupo contendo todos os animais imunizados com Nogo1-22, bem como alguns animais de outros grupos.

No que diz respeito aos antígenos seleccionados por este processo, uma vez mais confirma-se a existência de uma marcada diversificação de epítomos da resposta linfocitária B, quer intra quer intermolecular, a outros componentes da mielina do SNC. O alargamento da resposta de anticorpos assume a sua maior expressão em ratinhos SJL/J imunizados com Nogo45-66, e inclui vários epítomos antigénicos em outras proteínas, com anticorpos detectáveis contra a MAG (p193-208, p313-328), PLP (p10-29, p103-116, p190-209), MBP (p85-99, p121-139, p131-149), MOG (p19-36, p35-55), OSP

(p32-51), α B-cristalina (p121-140), e 3'-fosfodiesterase 2'-3' nucleótido cíclico (CNPase) (p343-373). No que diz respeito às imunizações com Nogo1-22 e Nogo23-44 nesta estirpe, e, sobretudo, na imunização da estirpe C57BL/6, a diversificação de epítomos é muito menos impressionante.

No seu conjunto, a análise do padrão de diversificação revelou perfis distintos para cada um dos antigénios utilizados na imunização, em cada estirpe. A partir dos péptidos Nogo1-22 e Nogo23-44, o alargamento da resposta linfocitária B atinge sobretudo um conjunto restrito de péptidos nas proteínas MBP, MOG e PLP; a partir do péptido Nogo45-66, a diversificação atinge vários outros alvos, tal como anteriormente mencionado, incluindo componentes da mielina não atingidos pelos outros péptidos utilizados na imunização (incluindo o epítomo imunodominante PLP139-151 na estirpe SJL/J) como a MAG, OSP, α B-cristalina e CNPase. Comparando os achados desta análise, com os dados clínicos obtidos das experiências de imunização com péptidos Nogo nestas duas estirpes, torna-se evidente que a diversificação da resposta de anticorpos está, provavelmente, relacionada com a encefalitogenicidade (Figuras 116A-D, Figura 26 e 27): em ratinhos SJL/J, a maior diversificação de anticorpos ocorre após imunização com Nogo45-66, tal como a maior frequência de sinais clínicos de EAE, incluindo paralisia dos membros posteriores, e lesões desmielinizantes/inflamatórias nas meninges e parênquima do SNC. Na mesma estirpe, a imunização com Nogo1-22 induz a segunda maior diversificação, e animais imunizados com este péptido apresentaram perda de tónus da cauda e, sobretudo, lesões meníngeas na análise histopatológica. Ratinhos SJL/J imunizados com Nogo23-44, e C57BL/6 imunizados com Nogo1-22 e Nogo23-44 exibiam relativamente menos diversificação, e não tinham sinais de doença clínica. Para o epítomo Nogo45-66 na estirpe C57BL/6, apesar de não haver reacção linfocitária T ou sinais de doença clínica, o alargamento da resposta de anticorpos foi superior ao encontrado com os outros dois epítomos Nogo-66.

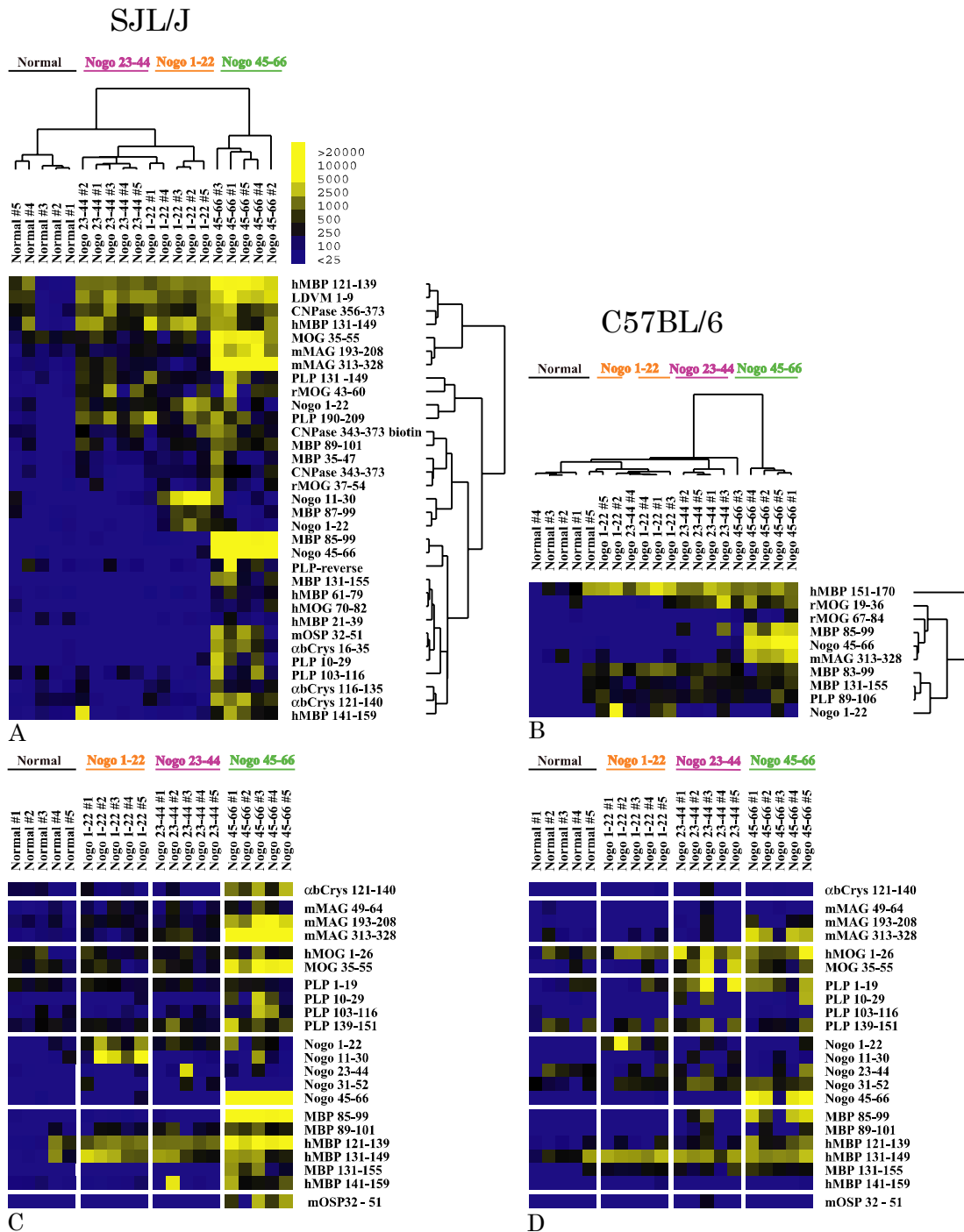


Figura 28. Mapas de reactividade representando a detecção de anticorpos contra proteínas e péptidos de mielina, nas estirpes SJL/J e C57BL/6 após imunização com os péptidos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66. A e B – mapas de reactividade restrita gerados por análise de agrupamento e contendo reactividades com diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo pré-imune (normal) para a estirpe SJL/J (A) e C57BL/6 (B). Ratinhos de ambas as estirpes foram imunizados com emulsões dos péptidos Nogo em ACF e soro retirado no dia 30 (SJL/J) ou 60 (C57BL/6) após imunização, para análise por *microarrays*. Cada coluna representa os resultados de um único animal de controle ou experiência, e cada fila a reactividade fluorescente contra um alvo antigénico, baseada na escala de cor apresentada. Os prefixos nos alvos antigénicos

denotam a espécie de onde o antígeno foi retirado (h-humano, gp-guinea pig, r-rat, m-mouse, SCH-spinal cord homogenate). C e D – Mapas de reactividade de um subgrupo de alvos antigénicos de mielina seleccionado para representar diferentes proteínas presentes nos *microarrays*. Resultados retirados da análise das reactividades após imunização de ratinhos SJL/J (C) e C57BL/6 (D) com péptidos Nogo.

No seu conjunto, estes dados sugerem que a encefalitogenicidade dos péptidos Nogo está relacionada com a ocorrência simultânea de respostas imunes celulares e humorais: apenas para os epítomos capazes de induzir uma resposta linfocitária T surgem sinais de doença clínica, e nestes, a sua gravidade está, provavelmente, relacionada com o grau de diversificação da resposta de anticorpos. Este conceito está de acordo com a conclusão, mencionada no capítulo sobre vacinação com ADN, de que a taxa de surtos em modelos de EAE crónica, como o induzido na estirpe SJL/J com o péptido PLP139-151, está, sobretudo, correlacionada com a magnitude do alargamento da resposta linfocitária B.

7. Especificidade da resposta linfocitária T contra péptidos Nogo-66, estudos de reactividade cruzada com outros antígenos de mielina e de diversificação de epítomos da resposta T.

Um dos critérios necessários para podermos afirmar que os péptidos Nogo utilizados para a indução de EAE são, de facto, novos autoantígenos, é a especificidade da resposta linfocitária, e a ausência de reactividade cruzada com outros antígenos de mielina, nomeadamente, com os epítomos encefalitogénicos imunodominantes PLP139-151 e MOG35-55, capazes de induzir EAE nas estirpes SJL/J e C57BL/6, respectivamente. Dada a possibilidade, como tal, de que o aparecimento de sinais clínicos e histológicos de EAE pudesse ser devida a reacção cruzada entre os péptidos Nogo e os epítomos imunodominantes já referidos, decidimos estudar a especificidade da resposta imune após imunização com estes antígenos. De forma a avaliar a especificidade da resposta linfocitária T na estirpe SJL/J, estabelecemos linhas celulares T reactivas contra os péptidos PLP139-151, Nogo1-22 e Nogo45-66, e testámos a sua proliferação contra um painel de

péptidos, incluindo todos os péptidos Nogo. Os resultados desta experiência (Figura 29) mostram que a linha celular anti-PLP139-151 prolifera apenas contra o seu antígeno cognato, e não contra qualquer um dos péptidos Nogo-66. Igualmente, as linhas celulares anti-Nogo1-22 ou Nogo45-66 não evidenciam qualquer resposta proliferativa para além do seu antígeno cognato, incluindo contra outros epítomos em diferentes proteínas tais como a PLP139-151, MOG35-55 ou MBP85-99. Tal observação é particularmente interessante pelo facto de que, após imunização com os péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66, foram detectados anticorpos contra estes alvos antigénicos com elevados valores de reactividade. Com base nestes resultados, podemos afirmar que a resposta linfocitária T, após imunização com péptidos Nogo, é específica, e que não existe reactividade cruzada entre os péptidos PLP139-151, Nogo1-22, 23-44 ou 45-66, ou entre os péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66 e PLP139-151, MBP85-99 ou MOG35-55.

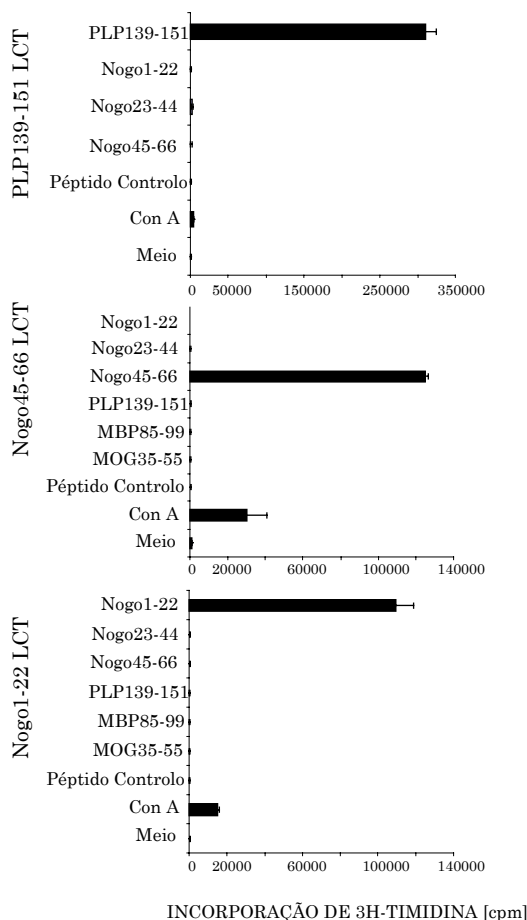


Figura 31. Especificidade da resposta linfocitária T na estirpe SJL/J. Linhas celulares T (LCT) foram estabelecidas a partir de ratinhos SJL/J imunizados com os péptidos PLP139-151, Nogo1-22 e Nogo45-66 e mantidas *in vitro*. A proliferação das LCT anti-Nogo foi testada contra um painel de péptidos Nogo (1-22, 23-44, 45-66), PLP139-151, MOG35-55, MBP85-99, péptido controlo (Vβ5.1), e concanavalina A (Con A) enquanto que a LCT anti-PLP foi testada apenas contra o seu antígeno cognato e todos os péptidos Nogo. Para cada condição foram usados 2×10^4 linfócitos T e 5×10^5 APC singénicas irradiadas por poço; todos os péptidos a $20 \mu\text{g/ml}$, Con A a $5 \mu\text{g/ml}$. Os resultados mostrados representam a média \pm DP de amostras triplicadas.

A avaliação da diversificação de epítomos da resposta T é particularmente difícil utilizando protocolos de indução activa de EAE, nos quais o péptido imunizador permanece no mesmo animal, durante semanas a meses, como estímulo antigénico emulsificado em ACF. Como tal, a presença deste antígeno e do adjuvante domina a resposta imune, e a maioria, se não a totalidade, dos linfócitos T *naive* que forem surgindo pelo processo normal de maturação tímica, terão grandes probabilidades de o encontrar e de reagir contra ele. A existir uma reacção T secundária contra outro antígeno, *i.e.* diversificação de epítomos, esta consistirá, provavelmente, em pequenos números de clones linfocitários, que muito dificilmente serão detectados em ensaios de proliferação linfocitária clássicos. Em numerosas experiências por nós realizadas (e noutras amplamente reportadas na literatura), é muito difícil encontrar evidência de diversificação após indução activa de EAE, quer utilizando os antígenos clássicos PLP139-151 ou MOG35-55, quer utilizando os antígenos Nogo (dados não mostrados, *e.g.* para o antígeno MOG35-55 na estirpe C57BL/6 imunizada com péptidos Nogo; na estirpe SJL/J, vários ensaios de proliferação linfocitária após indução de EAE com péptidos Nogo não evidenciaram proliferação contra o antígeno PLP139-151).

Na tentativa de escolher formas mais discriminativas de evidenciar respostas linfocitárias T contra outros antígenos de mielina que não os empregues na imunização, utilizámos ensaios ELISPOT, técnica com maior capacidade de detecção para pequenas populações clonais T. De forma a dar tempo para que se pudesse produzir uma eventual diversificação da resposta imune, imunizámos ratinhos SJL/J com os antígenos PLP139-151, MBP85-99 e Nogo45-66, e esperámos 3 meses para estudar a resposta linfocitária T. No final da experiência, isolámos esplenócitos e testámos, através de ensaios ELISPOT para a produção de interleucina 2 (IL-2), a presença de clones proliferativos, em animais individuais, contra um painel alargado de antígenos de mielina, incluindo, não só, os principais epítomos imunodominantes, mas também vários antígenos *minor* identificados, previamente, como alvos secundários da resposta imune nesta estirpe.

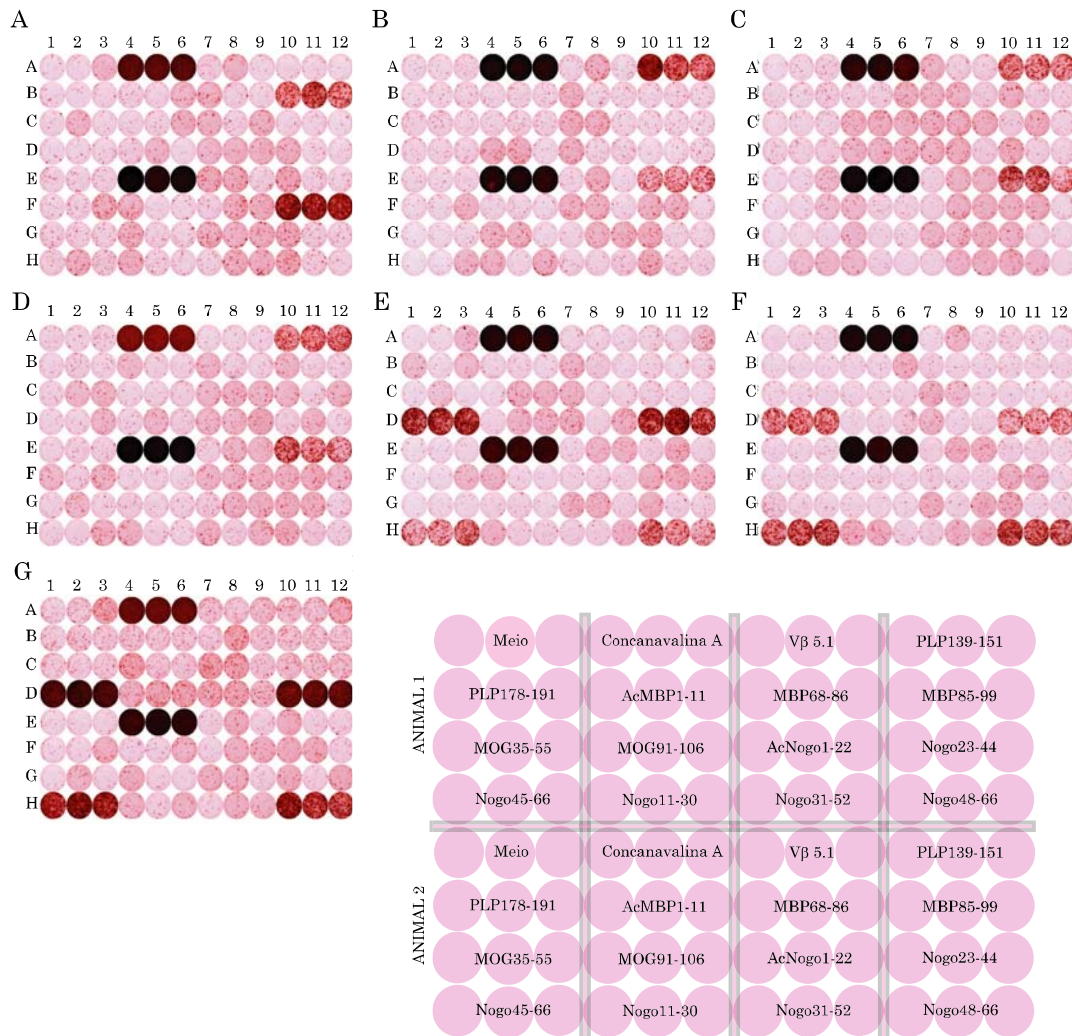


Figura 30A. Ensaios ELISPOT para a detecção de clones linfocitários T contra antígenos de mielina, após imunização com os péptidos PLP139-151, MBP85-99 e Nogo45-66 na estirpe SJL/J. No final da experiência, os baços foram retirados de animais individuais, culturas de esplenócitos totais estabelecidas, e a presença de clones linfocitários T reactivos contra um painel de péptidos de mielina medida por ensaio ELISPOT para a produção de IL-2. Imagens das placas de ELISPOT individuais, e esquema representando a distribuição dos antígenos por cada placa (todos os antígenos a 20 µg/ml; concanavalina A a 5 µg/ml). A – resultados da imunização com MBP85-99 (100 µg/animal/s.c. em duas doses separadas de 1 semana). B-D – resultados da imunização com PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.). E-G – resultados da imunização com Nogo45-66 (100 µg/animal/s.c. em duas doses separadas de 1 semana).

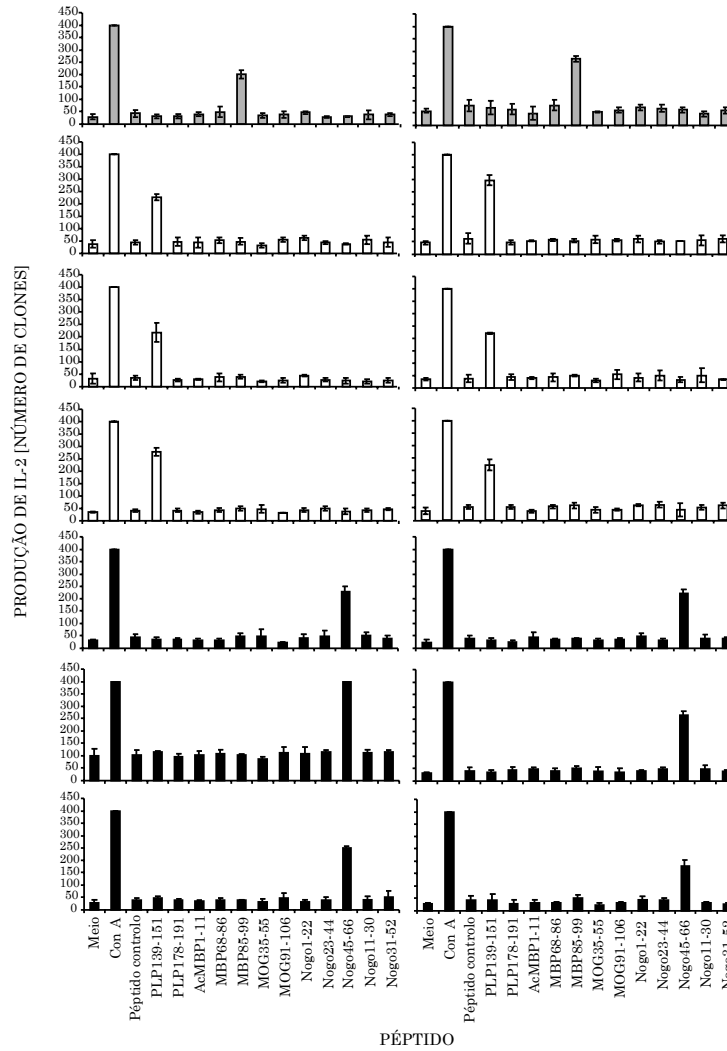


Figura 30B. Ensaios ELISPOT em ratinhos SJL/J imunizados com os peptídeos MBP85-99 (cinzento) PLP139-151 (branco) e Nogo45-55 (preto). Após o final da experiência, foram retirados os baços dos animais experimentais, estabelecidas culturas de esplenócitos totais e a presença de clones reativos contra vários peptídeos de mielina testada por ensaio ELISPOT para a produção de IL-2. O painel de antígenos incluía o antígeno imunizador (PLP139-151, MBP85-99, Nogo45-66), e vários epítopos minor (PLP178-191, AcMBP1-11, MBP68-86, MBP85-99, MOG35-55, MOG96-101), bem como peptídeos da sequência Nogo-66 (Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66) e peptído controle (Vβ5.1). Todos os peptídeos a 20μg/ml, concanavalina A (Con A) a 5μg/ml, 1x10⁶ esplenócitos por poço. Quantificação do número de clones identificados (média de clones contados ± DP de amostras triplicadas.) a partir de esplenócitos de animais individuais 140 (PLP139-151 e MBP85-99) ou 120 dias (Nogo45-66) após imunização.

Os resultados desta experiência (Figura 30A-B) confirmaram a presença de números elevados de clones reativos contra o antígeno imunizador, como seria de esperar, mas não a existência de diversificação da resposta a qualquer outro dos antígenos presentes. Assim, após imunização

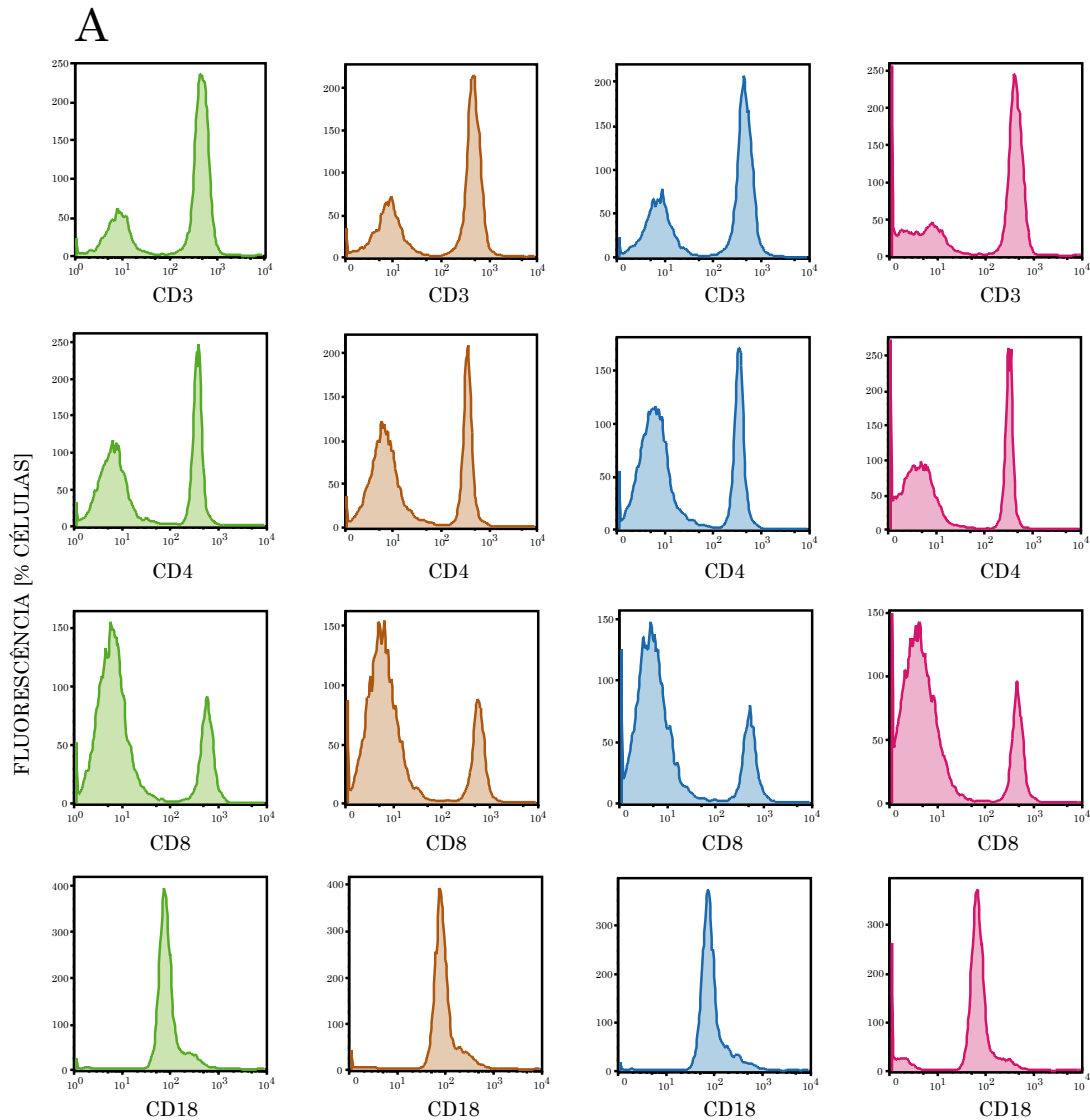
com PLP139-151 ou MBP85-99, não é detectável qualquer diversificação intramolecular ou intermolecular, incluindo para péptidos Nogo, tal como após imunização com Nogo45-66 não é aparente diversificação da resposta para qualquer outro antígeno de mielina, incluindo o epítipo imunodominante PLP139-151. A interpretação destes resultados pode ser que não existe diversificação da resposta T, e, igualmente, que não há reactividade cruzada contra os outros antígenos presentes; em alternativa, é, igualmente, possível, que a própria natureza do protocolo experimental, *i.e.* que a imunização com péptido e ACF, tal como anteriormente foi mencionado, impeça a detecção do fenómeno de diversificação. De qualquer forma, podemos afirmar que, até ao limite de detecção das técnicas que utilizámos, e dentro do protocolo de indução de EAE activa, não nos foi possível observar diversificação de epítopos da resposta T a partir dos péptidos Nogo, ou para eles a partir de outros antígenos de mielina.

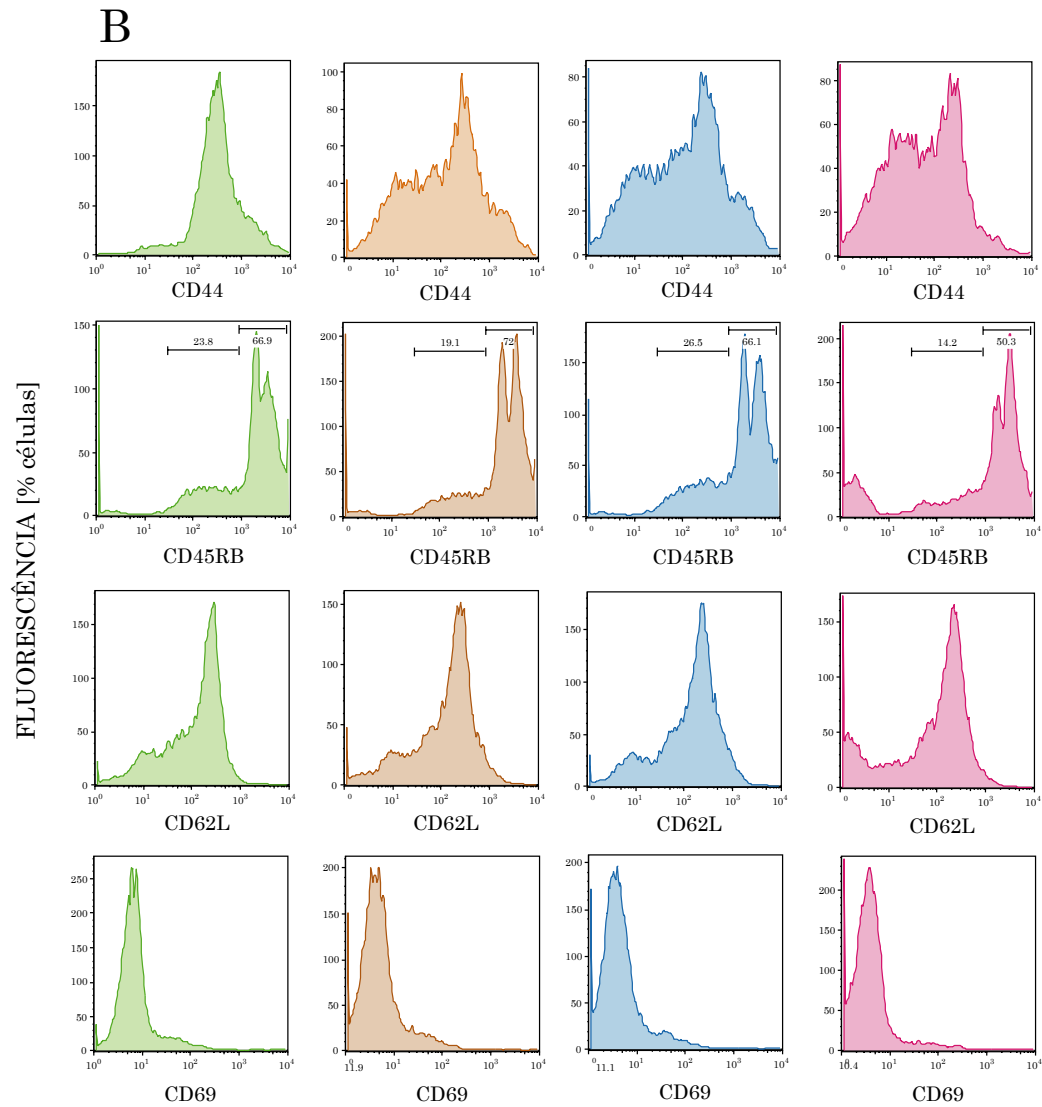
8. Tentativas de indução de EAE por transferência adoptiva de linhas celulares anti-Nogo, estudos de marcadores de activação e memória, transferência de linhas celulares anti-Nogo para tratamento de EAE estabelecida.

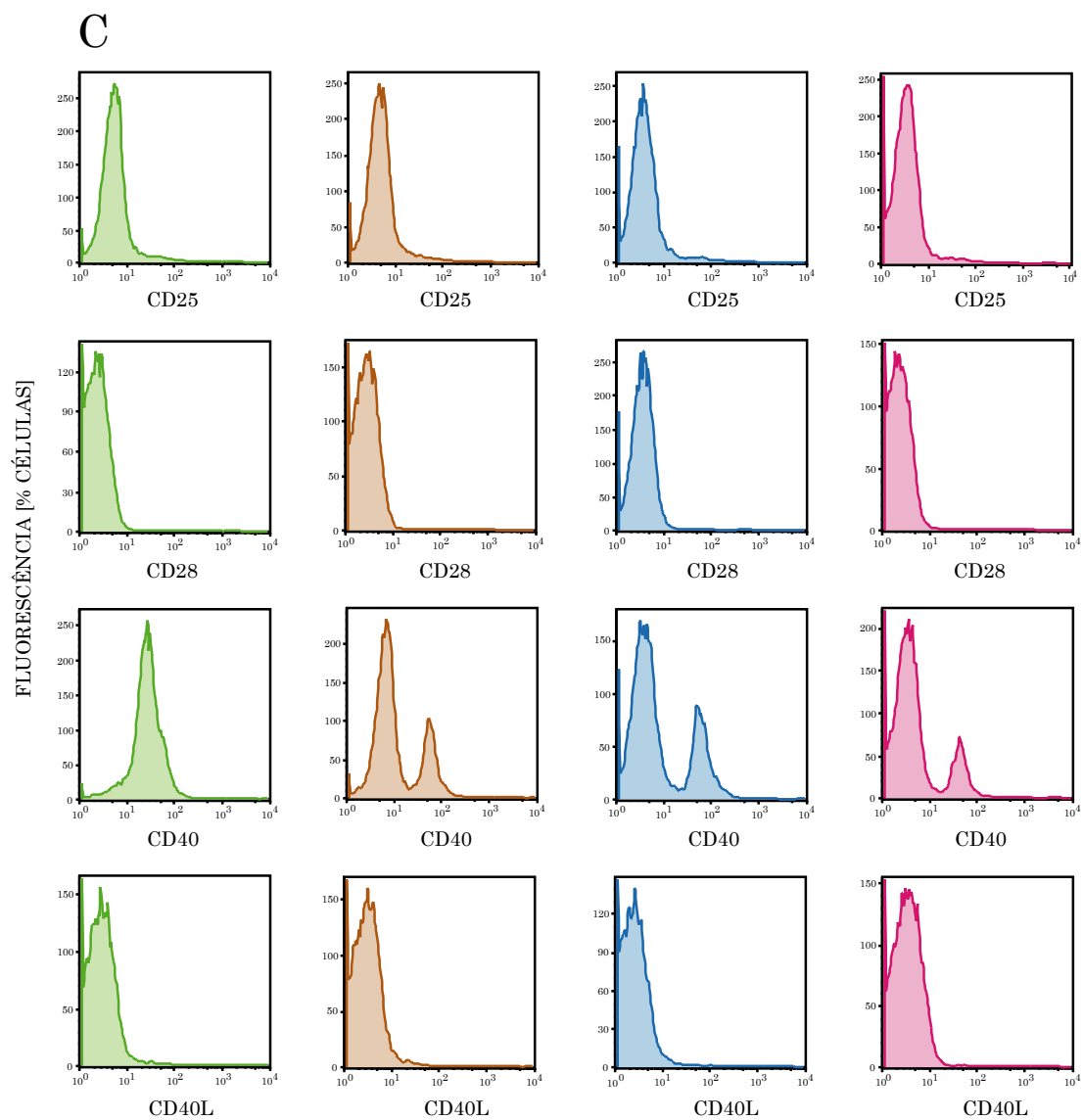
Apesar da existência de respostas linfocitárias T e B potentes, e com marcada diversificação de epítopos da resposta B para alguns dos péptidos utilizados, houve grande dificuldade em induzir sinais clínicos e histológicos de EAE nas duas estirpes testadas, só havendo sucesso parcial para a estirpe SJL/J induzida com Nogo45-66, conforme referido anteriormente. A preponderância de sinais histológicos de meningite, em comparação com a existência de focos inflamatórios/desmielinizantes no parênquima do SNC, fez-nos ponderar se poderiam existir défices na apresentação destes antígenos, nomeadamente por fraca co-estimulação, ou défices na activação linfocitária após reconhecimento do antígeno, que pudessem comprometer a capacidade efectora das células, e, consequentemente, resultar em fenótipos clínicos menos graves. Para avaliar essa possibilidade, imunizámos ratinhos

SJL/J para indução de EAE, com os péptidos Nogo1-22, Nogo45-66 e PLP139-151 e procedemos à avaliação fenotípica dos linfócitos e células apresentadoras de antigénio por citometria de fluxo. Uma vez que o protocolo utilizado para indução de EAE ser diferente para os péptidos Nogo e para o péptido PLP139-151, para os primeiros a avaliação foi feita 19 dias após a imunização inicial, e 12 dias para o segundo. A partir de células obtidas dos gânglios linfáticos periféricos, avaliámos a presença de marcadores fenotípicos gerais (CD3, CD4, CD8, CD11c), moléculas co-estimuladoras (CD28, CTLA-4, CD80, CD86) e marcadores de activação e memória (CD25, CD40, CD40L, CD45RB, CD62L e CD69) por citometria de fluxo com marcação simples e dupla (Figura 31A-D, 32A-D, 33). Em relação às marcações simples, observa-se, de uma forma geral, a existência de níveis mais baixos de fluorescência no grupo PLP139-151, para quase todos os anticorpos usados, incluindo para os marcadores de activação linfocitária CD18 (cadeia β 2-integrina), CD25 (cadeia α do receptor da IL-2), CD62L (L-selectina) e CD69 (*very early activation antigen*). Tal está de acordo com os diferentes tempos que decorreram desde o contacto com o antigénio imunizador, uma vez que, para os péptidos Nogo, o protocolo de imunização havia começado 7 dias mais cedo. Na marcação dupla, o mesmo fenómeno repete-se para o grupo PLP139-151; para além dos marcadores de activação mais baixos presentes na população CD3+, há, naturalmente, menos linfócitos com fenótipo de memória (CD3+CD45RB_{low}; CD3+CD44_{high}). No que diz respeito às células apresentadoras de antigénio, a co-marcação para células dendríticas (CD11c) e moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86) mostrou, igualmente, menor activação desta população, com valores inferiores para este grupo.

Figura 31A-D. Detecção da presença de marcadores de membrana por citometria de fluxo em células de gânglio periférico de ratinhos SJL/J imunizados com PLP139-151 (rosa), Nogo1-22 (laranja) e Nogo45-66 (azul) em ACF, ou controle imunizado com PBS em ACF (verde). Ratinhos SJL/J naïve foram imunizados com emulsões de péptidos Nogo em ACF (300 µg/animal duas vezes com o intervalo de 1 semana, seguido de PTX 300ng/animal/e.v. duas vezes com intervalo de 48 horas) ou a mesma emulsão do péptido PLP139-151 (100 µg/animal). Doze dias depois da última injeção de péptido (correspondendo a 19 dias depois da primeira injeção para os péptidos Nogo), os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas e a presença de proteínas membranáreas avaliada por citometria de fluxo com marcação simples. Para cada condição foram marcadas 1×10^6 células, e a presença de marcadores fluorescentes avaliada por citometria de fluxo.







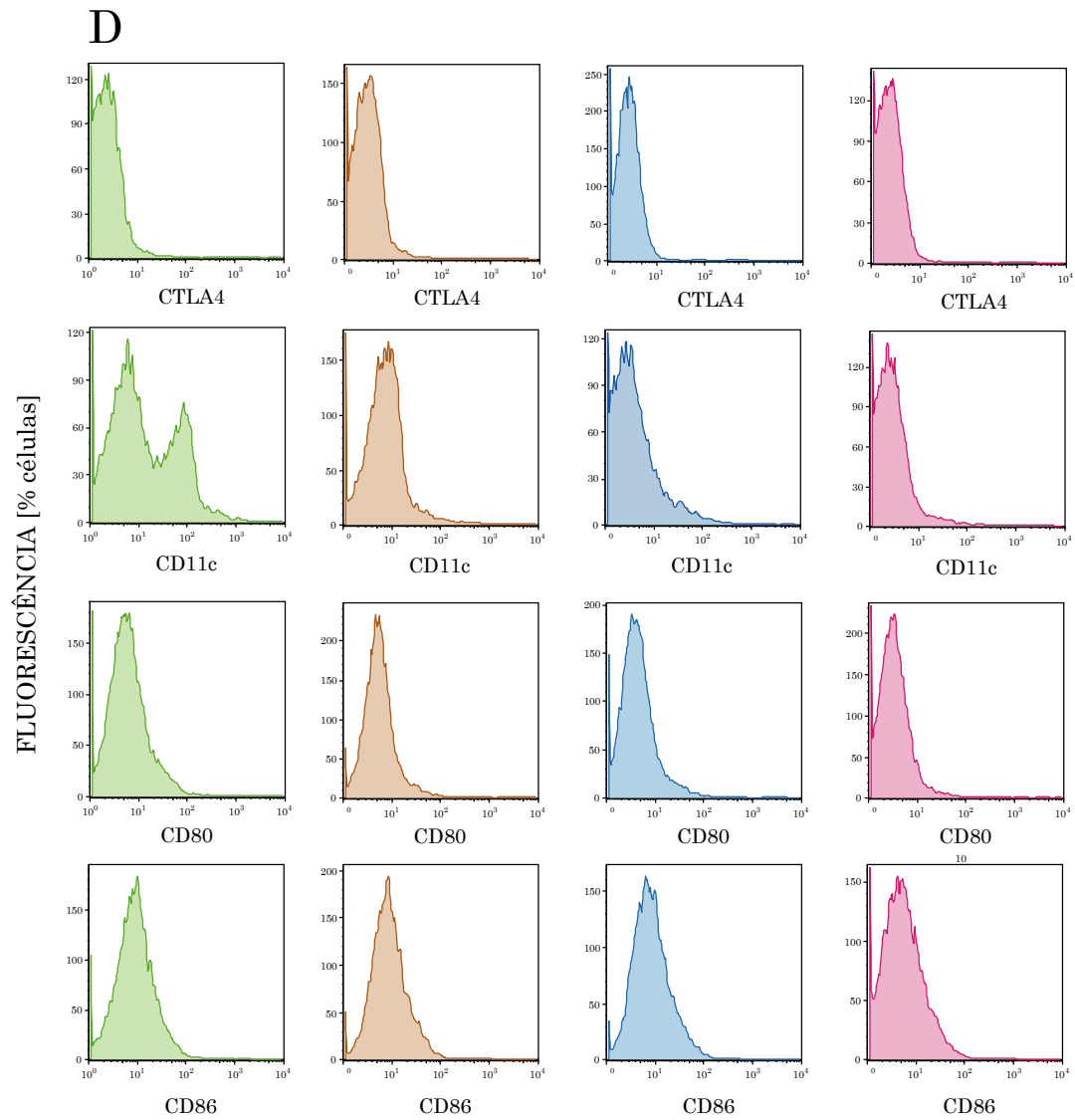
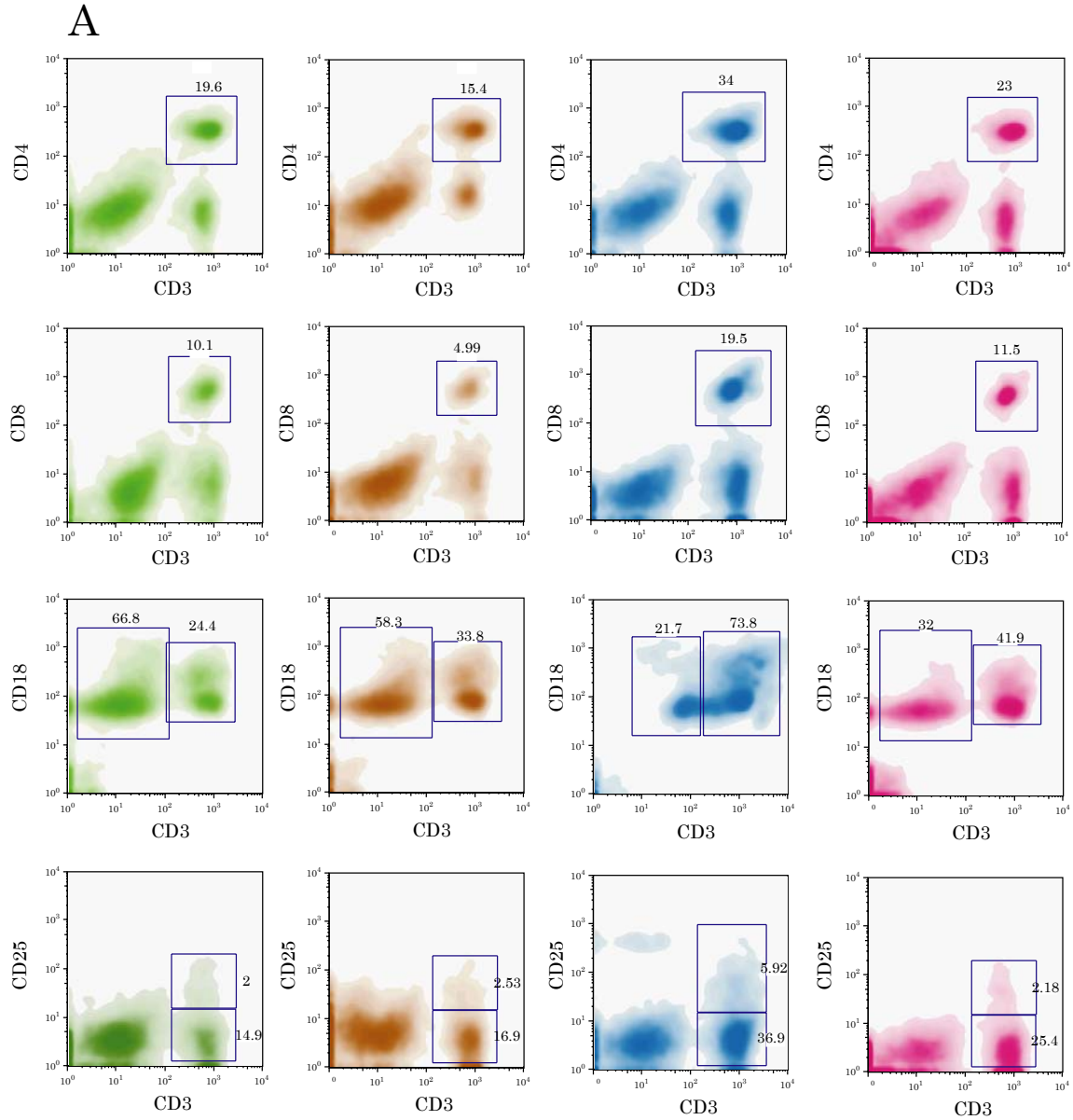
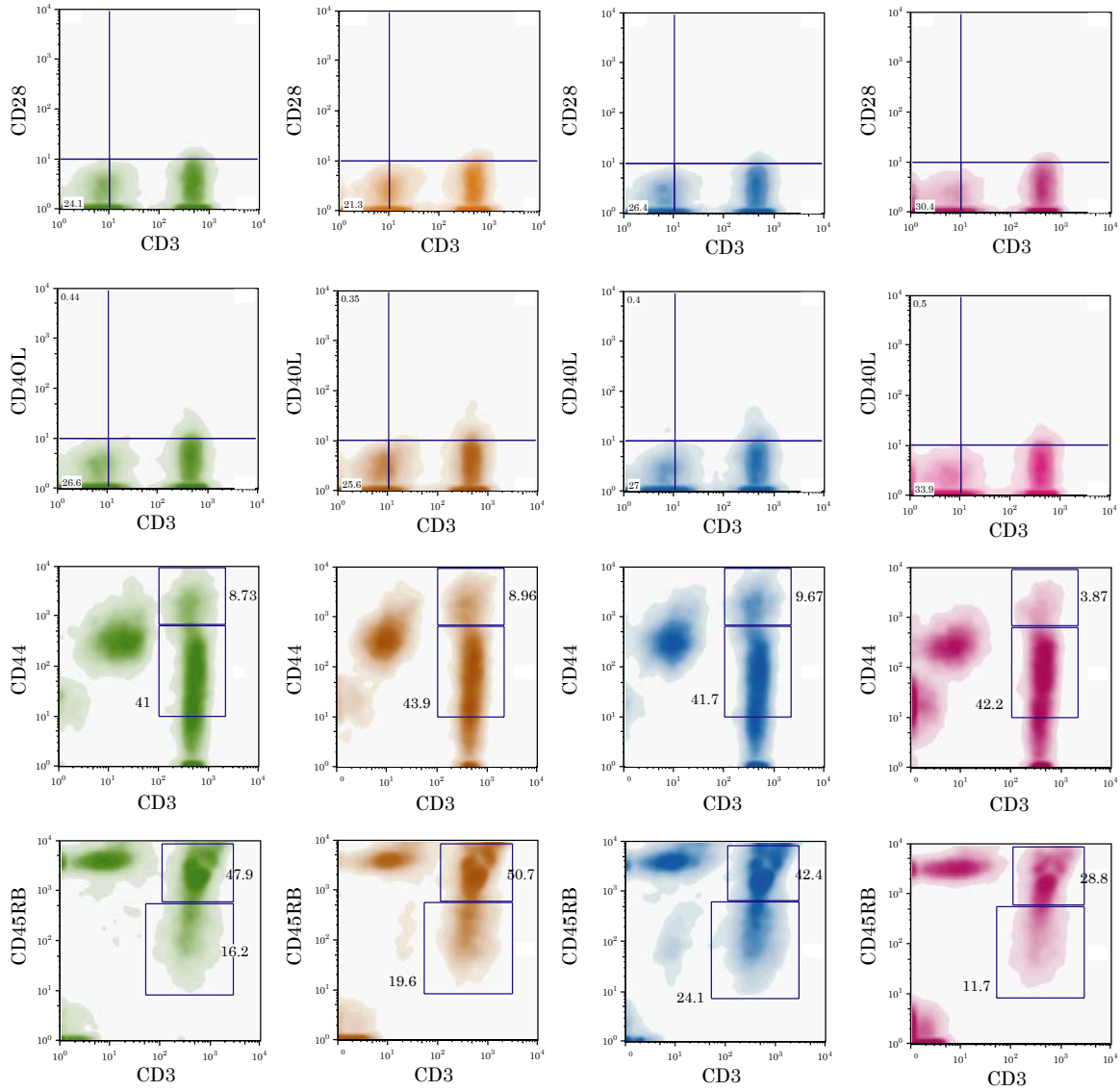


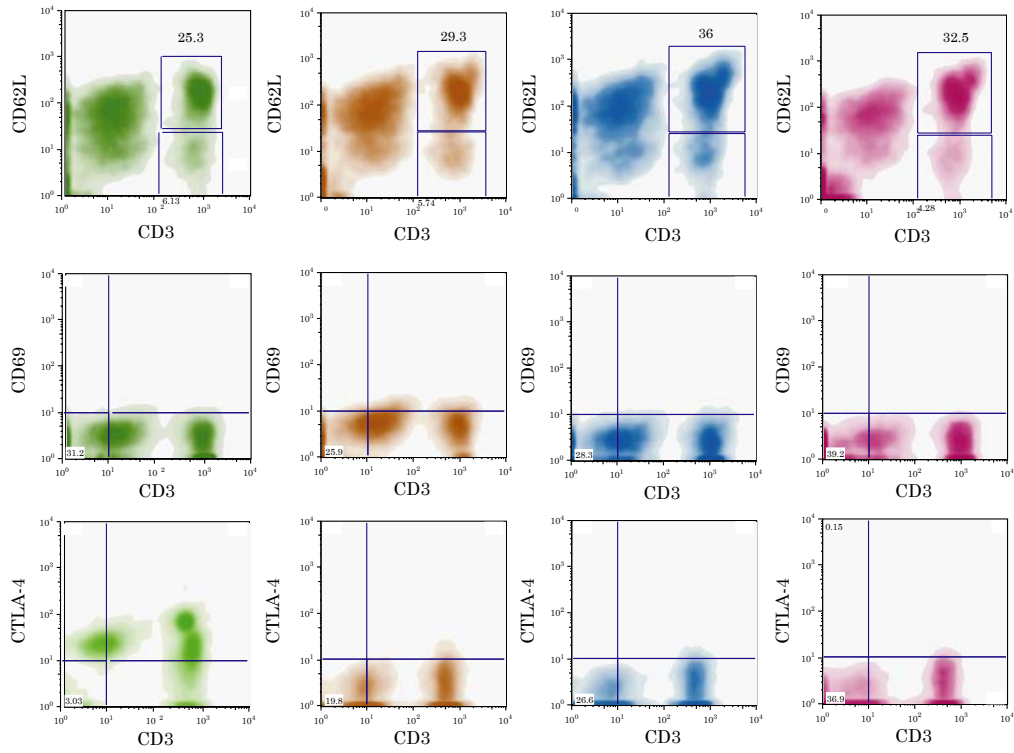
Figura 32A-D. Detecção da presença de marcadores de membrana por citometria de fluxo em células de gânglio periférico de ratinhos SJL/J imunizados com PLP139-151 (rosa), Nogo1-22 (laranja) e Nogo45-66 (azul) em ACF, ou controle imunizado com PBS em ACF (verde). Na mesma experiência que anteriormente, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas linfocitárias estabelecidas e a presença de proteínas membranárias avaliada por citometria de fluxo com marcação dupla após escolha de pares de anticorpos conjugados com fluoróforos diferentes (PE e FITC). Para cada condição foram marcadas 1×10^6 células, e a presença de marcadores fluorescentes avaliada por citometria de fluxo.



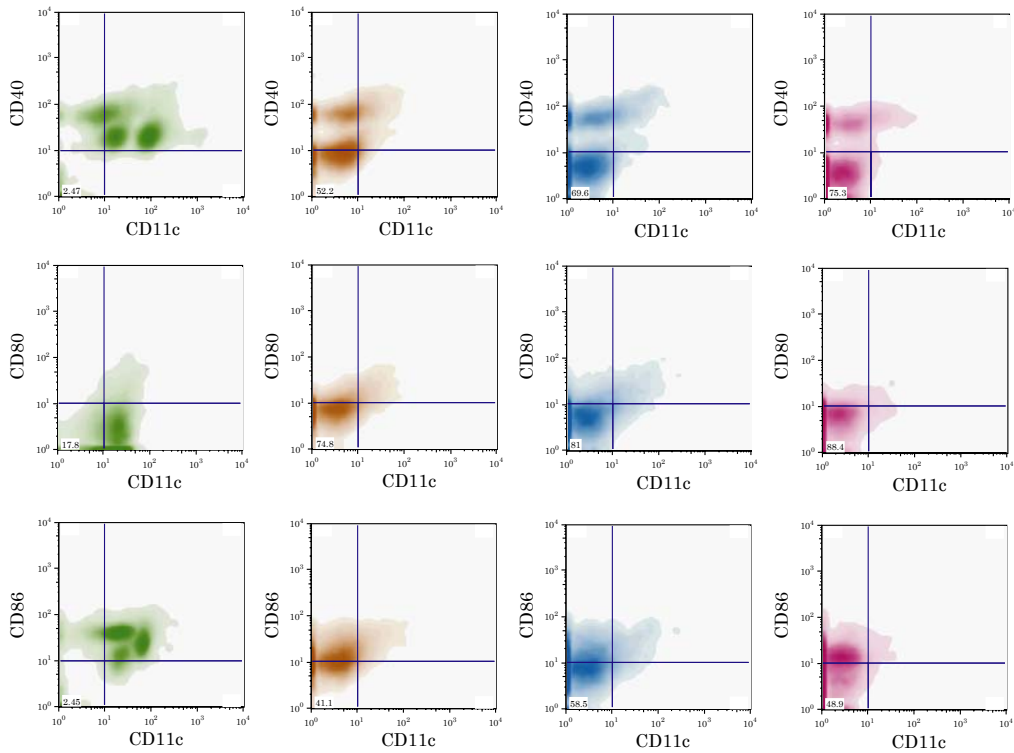
B



C



D



Comparando os dois grupos imunizados com péptidos Nogo, existem igualmente algumas diferenças interessantes, nomeadamente no que diz respeito às subpopulações linfocitárias e marcadores de activação. A população linfocitária total (CD3+) de ratinhos imunizados com Nogo45-66 apresenta valores mais elevados quer de linfócitos T_{helper} (CD3+CD4+, 34%), quer $T_{citotóxicos}$ (CD3+CD8+, 19.5%) quando comparada com a sua congénere Nogo1-22; observam-se também valores mais elevados de CD18 (73.8% contra 33.8%) e de CD62L (36% contra 25.3%). Não existem diferenças apreciáveis no que diz respeito a marcadores de memória CD3+CD45RBlow e CD3+CD44high, apenas uma discreta tendência para o grupo Nogo45-66 ter valores mais elevados. No que diz respeito aos pares de moléculas co-estimuladoras CD28/CTLA-4 – CD80/CD86, e CD40-CD40L, não são aparentes diferenças significativas entre os dois grupos. No seu conjunto, estes resultados parecem indicar que para a estirpe SJL/J o péptido Nogo45-66 é o melhor antígeno entre os dois péptidos Nogo utilizados, e igualmente que, comparativamente com a imunização com o péptido encefalitogénico PLP139-151, não parece haver diferenças significativas no que diz respeito à apresentação de antígeno, co-estimulação ou activação linfocitária que justifiquem a relativa dificuldade em induzir doença desmielinizante.

	CD3+	CD4+	CD8+	CD18+	CD25+	CD28+	CTLA-4+	CD40L+	CD44+
Nogo1-22	62.5	36.5	20.2	96.2	9.14	0.56	2.6	3.03	85.6
Nogo45-66	61.0	32.2	18.3	94.5	7.22	0.45	1.81	2.12	81.9
PLP139-151	61.1	35.3	17.1	85.8	4.93	0.4	0.81	3.0	80.7
	CD45RBhigh	CD45RBlow	CD62L+	CD69+	CD11c+	CD80+	CD86+	CD40+	
Nogo1-22	72.0	19.1	88.4	11.1	8.02	15.4	39.7	26.9	
Nogo45-66	66.1	26.5	88.5	10.4	6.11	12.3	37.5	26.9	
PLP139-151	50.3	14.2	75.4	6.78	2.19	5.98	22.6	16.4	
	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD3+CD18+	CD3+CD25+	CD3+CD28+	CD3+CTLA-4+	CD3+CD40L+	CD3+CD44high	
Nogo1-22	15.4	4.99	33.8	2.53	1.68	2.36	4.23	8.96	
Nogo45-66	34.0	19.5	73.8	5.92	1.37	1.63	3.26	9.67	
PLP139-151	23.0	11.5	41.9	2.18	1.22	1.4	2.51	3.87	
	CD3+CD44low	CD3+CD34RBhigh	CD3+CD45RBlow	CD3+CD62L+	CD3+CD69+	CD11c+CD80+	CD11c+CD86+	CD11c+CD40+	
Nogo1-22	43.9	50.7	19.6	25.3	1.64	6.96	9.11	10.5	
Nogo45-66	41.7	42.4	24.1	36.0	1.66	6.22	6.85	7.89	
PLP139-151	42.2	28.8	11.7	32.5	0.83	1.87	2.56	4.2	

Figura 33. Quantificação dos marcadores de citometria de fluxo em células de gânglio linfático periférico de ratinhos SJL/J imunizados com os péptidos Nogo1-22, Nogo45-66 e PLP139-151. Resumo dos resultados da figura 33A-D e 34A-D apresentados em forma de tabela para comparação.

Na tentativa de melhorar a eficácia de indução de doença, eliminando a variabilidade inevitável ao processo de indução activa de EAE – particularmente complexa neste caso pela necessidade de injeção endovenosa de PTX -, fizemos várias experiências de transferência adoptiva de linhas celulares anti-Nogo. Para tal, imunizámos ratinhos SJL/J com emulsões de Nogo1-22 ou Nogo45-66 (os epítomos T reconhecidos para esta estirpe) em ACF, e retirámos os gânglios linfáticos de drenagem 10 dias após a imunização. A partir destes, estabelecemos culturas linfocitárias totais *in vitro*, que foram estimuladas periodicamente com o respectivo péptido Nogo na presença de APC singénicas irradiadas. Após alguns ciclos de proliferação (em média 2), obtivemos linhas celulares T relativamente puras para o péptido Nogo em questão, que utilizámos para avaliação fenotípica através de citometria de fluxo. Como se pode observar (Figura 34A-B), a população avaliada era, praticamente, constituída somente por células T CD3+ (linfócitos), com presença de populações CD4+ e CD8+ em ambos grupos. A avaliação da presença de marcadores de activação (CD25), co-estimulação (CD28 e CTLA-4) e memória (CD45RB) não revelou diferenças significativas entre ambas as linhas celulares. A avaliação por citometria com dupla marcação (Figura 34A-B) permitiu revelar diferenças nas percentagens relativas de linfócitos T CD4+ e CD8+, com cerca de 10% (78.1 para 67.2) mais linfócitos CD4+ para a linha Nogo1-22 e 10% (18.4 para 29.6) mais linfócitos CD8+ para a linha Nogo45-66. Não foram observadas diferenças significativas na presença de moléculas co-estimuladoras, no marcador de activação CD25, ou na percentagem de células com fenótipo de memória CD45RBlow (cerca de 45% para ambas as linhas celulares).

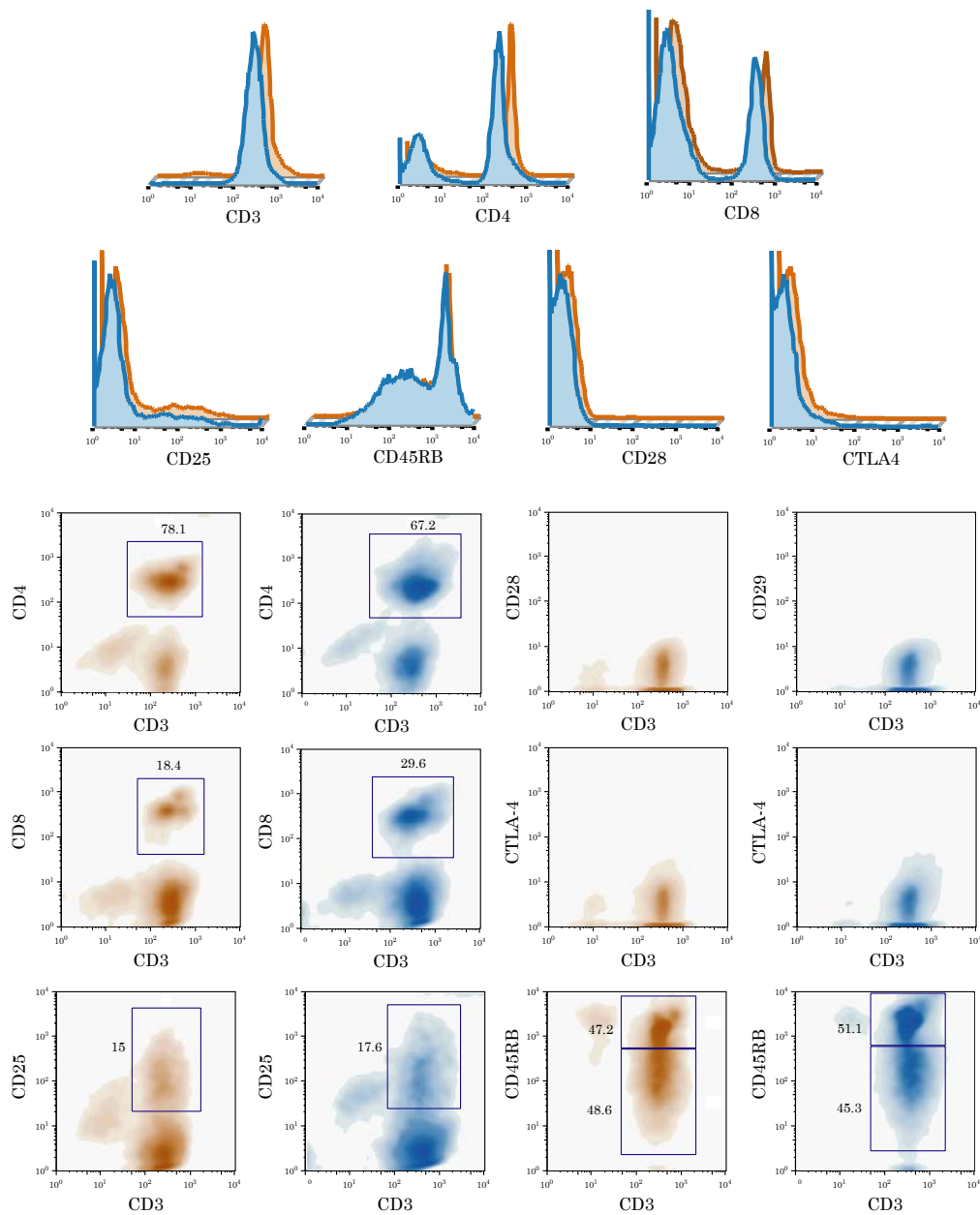


Figura 34A. Detecção da presença de marcadores de membrana por citometria de fluxo em linhas celulares anti-Nogo1-22 (laranja) ou anti-Nogo45-66 (azul) mantidas *in vitro* e estimuladas periodicamente com o seu péptido cognato.

	CD3+	CD4+	CD8+	CD25+	CD28+	CTLA-4+	CD45RB ^{high}	CD45RB ^{low}
Nogo1-22	96.1	72.8	23.1	14.3	0.089	1.19	51.8	44.6
Nogo56-66	98.6	64.5	32	14.8	0.14	2.87	46.1	52.1
	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD3+CD25+	CD3+CD28+	CD3+CTLA-4+	CD3+CD45RB ^{high}	CD3+CD45RB ^{low}	
Nogo1-22	78.1	18.4	15.0	1.32	2.42	47.2	48.6	
Nogo56-66	67.2	29.6	17.6	1.38	4.31	51.1	45.3	

Figura 34B. Quantificação dos marcadores de citometria de fluxo em linhas celulares anti-Nogo1-22 e Nogo45-66. Linhas celulares T foram estabelecidas a partir de ratinhos SJL/J imunizados com os péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66 e mantidas *in vitro* com estimulação periódica com o seu péptido cognato. Ao fim de dois ciclos de proliferação, a presença de proteínas na membrana celular foi avaliada através de citometria de fluxo, empregando anticorpos contra as moléculas CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CTLA-4 e CD45RB; para marcação dupla, foram escolhidos pares de anticorpos conjugados com fluoróforos diferentes (PE e FITC). Para cada condição foram marcadas 1×10^6 células, e a presença de marcadores fluorescentes avaliada por citometria de fluxo.

Tendo sido identificada a presença de restrições de repertório do receptor da célula T (TCR) em clones encefalitogénicos de linfócitos T responsáveis pelo aparecimento de EAE em estirpes murinas susceptíveis, e também em doentes com EM (conforme revisto no Capítulo II), resolvemos estudar a diversidade do repertório da cadeia beta, nas linhas celulares T anti-Nogo em ratinhos SJL/J, em comparação com linhas celulares T anti-PLP139-151 na mesma estirpe. Para tal, utilizámos linhas celulares anti-PLP139-151 já estabelecidas no nosso laboratório, e com fenótipos Th muito bem definidos e irreversíveis; uma das linhas segrega predominantemente $\text{IFN}\gamma$ em resposta ao seu péptido cognato (Th1), enquanto que outra segrega IL-10 e IL-4 (Th2)^f. Extraímos ARN total a partir destas linhas celulares, bem como das linhas celulares anti-Nogo1-22 e Nogo45-66, e fizemos ADNc a partir de ARNm utilizando uma estratégia oligo-dT. A avaliação do repertório da região variável da cadeia beta do receptor da célula T (V β) foi feita através de RPC com *primers* específicos desenhados para amplificar dezanove cadeias TCR-V β e um *primer* comum C β (descritas por BELL *et al.* (27)), sendo os resultados analisados por electroforese em gel de agarose. Conforme se pode observar (Figura 35), existem diferenças e semelhanças na utilização do repertório V β por parte das linhas celulares anti-Nogo, em comparação com linhas celulares anti-PLP.

^f Estas mesmas linhas foram já descritas e utilizadas em várias experiências descritas no Capítulo anterior.

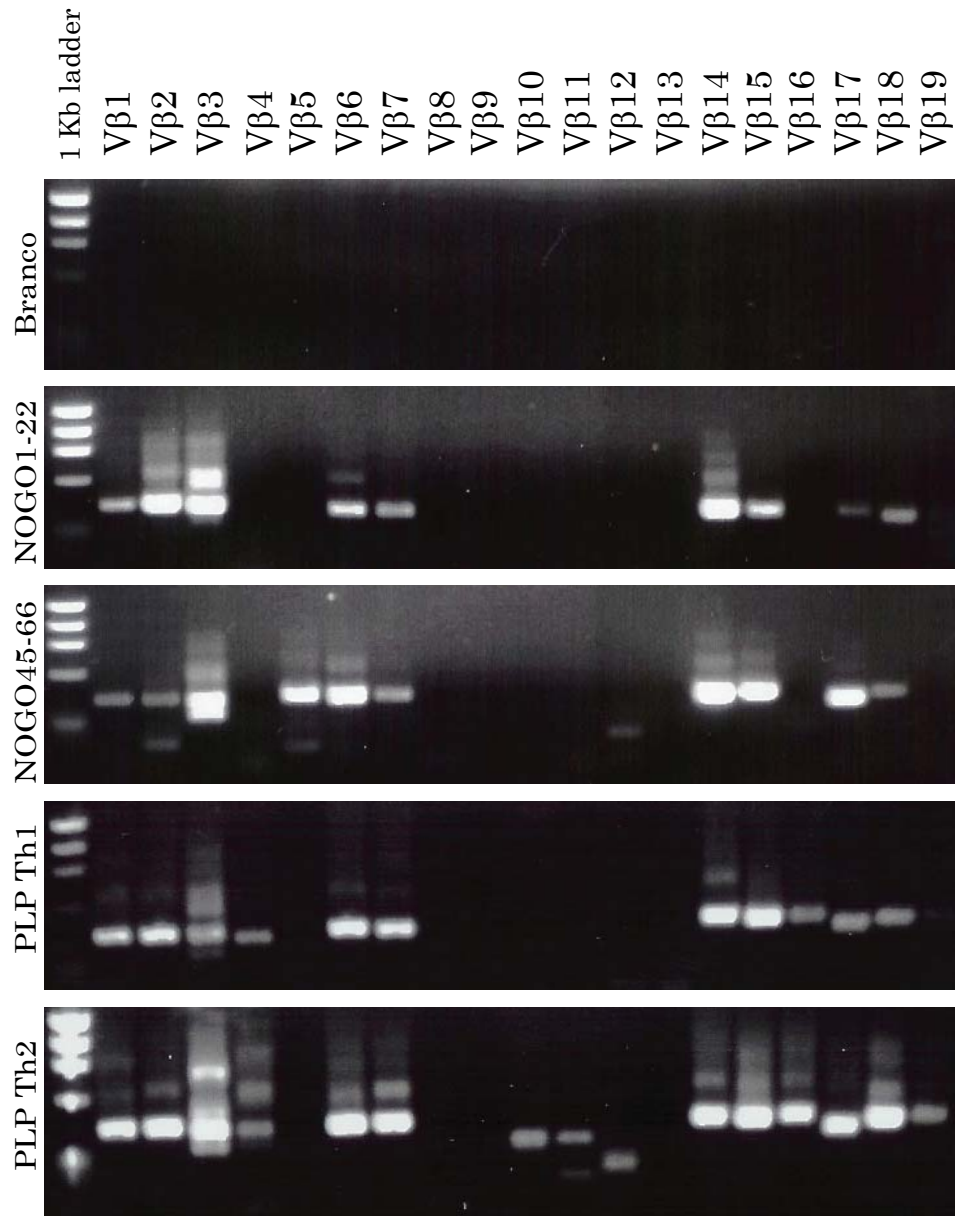


Figura 35. Expressão do repertório V β do receptor da célula T em linhas celulares T anti-Nogo1-22, Nogo45-66, e PLP139-151 (Th1 e Th2). Linhas celulares linfocitárias foram estabelecidas *in vitro* conforme descrito, ARN total extraído a partir de 1×10^6 células e ADNc sintetizado a partir de ARNm utilizando uma estratégia oligo-dT. A presença de ARNm correspondendo às diferentes cadeias V β foi detectada através de RPC utilizando *primers* específicos para cada sequência V β e um *primer* C β comum. Mostrada a detecção de amplicões para cada cadeia em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio comparada com escada de ADN de 1Kb.

Não parece existir, em primeiro lugar, o uso preponderante de nenhuma cadeia V β por qualquer destas linhas celulares, ao contrário do que tem sido descrito para outros péptidos, mas tal como tinha sido descrito para o péptido PLP139-151. Entre as duas linhas celulares anti-PLP, a linha Th2 utiliza, para além das mesmas cadeias que a Th1, as cadeias V β 10, 11, 12 e 19. Ao contrário das linhas anti-PLP, nenhuma das linhas Nogo utiliza V β 4 ou V β 16; a linha Nogo1-22 não possui nenhuma característica diferenciadora, enquanto que na linha Nogo45-66 se detecta a utilização das cadeias V β 5 e V β 12. Para a cadeia V β 5, a linha Nogo45-66 é a única das quatro linhas celulares testadas na qual ARNm foi detectado.

Fizemos várias tentativas de transferência adoptiva de EAE (imunização passiva) através da administração endovenosa de linhas celulares T anti-Nogo1-22 ou anti-Nogo45-66 em ratinhos SJL/J *naive*, utilizando até um máximo de 5×10^7 linfócitos por animal. Em outras experiências, transferimos endovenosamente 1×10^7 linfócitos anti-Nogo para ratinhos SJL/J ou PLJ/SJL-F1 *naive*, seguida duas semanas depois de imunização activa com o péptido cognato e administração endovenosa de *pertussis*, de forma a quebrar a barreira hemato-encefálica. Desta forma, pretendemos ter uma população numerosa de linfócitos reactivos antes de realizar o protocolo de imunização activa, para potenciar a eficácia deste último. Em qualquer dos casos, apesar de podermos demonstrar a presença de linfócitos reactivos nos gânglios periféricos dos animais experimentais, através de respostas proliferativas *in vitro* (Figura 36), não nos foi possível observar sinais clínicos de EAE.

A impossibilidade de induzir sinais clínicos de EAE, apesar da capacidade de criar linhas celulares T viáveis, com capacidade proliferativa e efectora aparentemente normal, levou-nos a colocar a hipótese de que, no seu estado nativo, a sequência Nogo-66, visto ser um componente relativamente pouco abundante da mielina, pudesse ser um antígeno críptico. Uma vez que, no estado saudável do animal experimental, esta proteína não teria contacto directo com o exterior, mesmo sendo possível

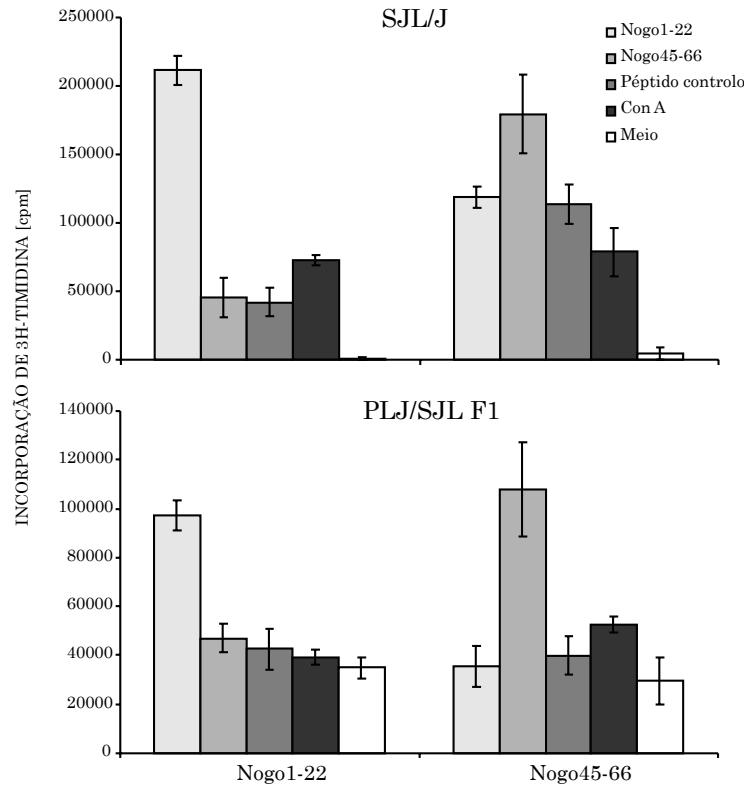


Figura 36. Transferência adoptiva de linhas celulares anti-Nogo1-22 e Nogo45-66 para ratinhos SJL/J e PL/JxSJL/J F1. Linhas celulares reactivas contra Nogo1-22 e Nogo45-66 foram estabelecidas *in vitro* e transferidas endovenosamente (1×10^7 /animal) para ratinhos SJL/J e PLJ/SJL F1 naive. Duas semanas após a transferência, os animais foram imunizados activamente com emulsões de Nogo1-22 e Nogo45-66 em ACF ($100 \mu\text{g}/\text{animal}$) conjuntamente com duas injeções de PTX ($400\text{ng}/\text{animal}/\text{e.v.}$) separadas de 48 horas. Trinta dias após a imunização activa, os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, e ensaios de proliferação linfocitária estabelecidos contra os péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66, péptido controlo ($\text{V}\beta 5.1$) e concanavalina A (Con A). Todos os péptidos a $20\mu\text{g}/\text{ml}$, concanavalina A a $5\mu\text{g}/\text{ml}$, colocadas 4×10^5 células/poço no grupo SJL/J e 2×10^5 células no grupo PLJ/SJL F1. Os resultados mostrados são contagens médias por minuto (cpm) \pm DP de amostras duplicadas.

induzir uma resposta imune contra antígenos a ela pertencentes, após a imunização os elementos da resposta imune não tivessem, de seguida, disponível no SNC o mesmo antígeno como alvo para reactivação linfocitária ou para ligação a anticorpos. Como tal, decidimos tentar a mesma transferência adoptiva de linhas celulares T anti-Nogo para animais já doentes com EAE induzida por outro péptido.

Nestas circunstâncias, uma vez que, nas zonas de inflamação aguda e desmielinização, existe destruição da bainha de mielina, péptidos da sequência Nogo-66 poderiam estar disponíveis para apresentação a células

T, levando à sua reativação. Induzimos EAE em ratinhos SJL/J com o epítipo encefalitogénico PLP139-151 e seguimos o seu curso clínico; na altura do segundo surto (dia 31 pós-imunização), randomizámos os animais de experiência e administrámos semanalmente linhas celulares anti-Nogo1-22 ou Nogo45-66, ou PBS simples, por via endovenosa. Optámos por não administrar uma linha celular anti-PLP139-151 como controlo positivo nesta experiência; numa experiência comparável de transferência adoptiva de linhas celulares anti-PLP139-151 para ratinhos SJL/J *naive* o resultado da administração de 1×10^6 células (Figura 37) demonstrou claramente o potencial encefalitogénico desta administração.

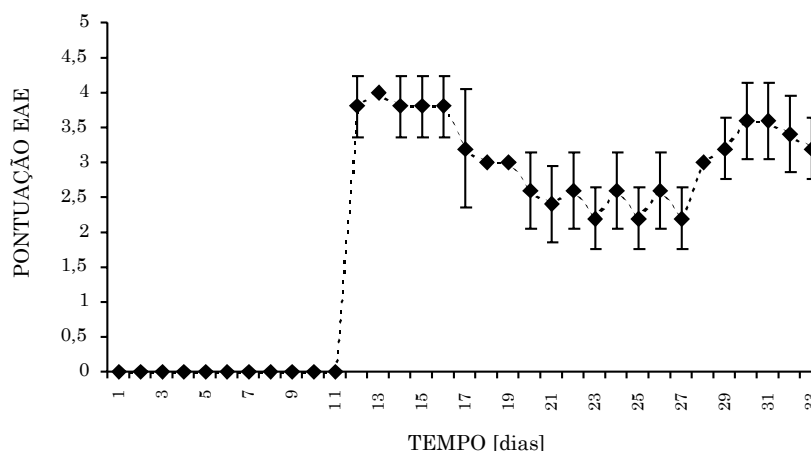
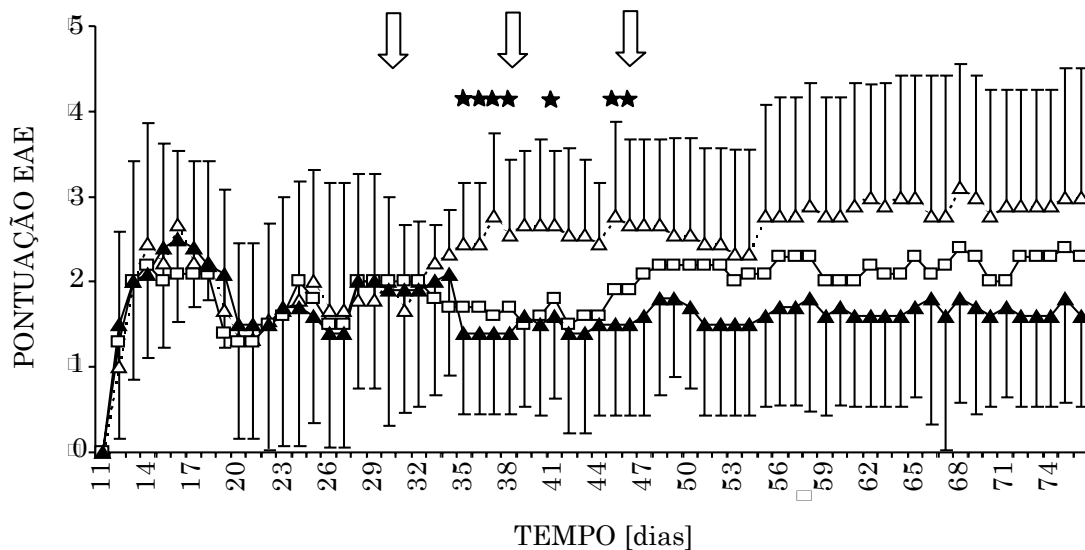


Figura 37. Indução de EAE por transferência adoptiva de linhas celulares T anti-PLP139-151. Ratinhos SJL/J *naive* foram imunizados com o péptido PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) e dez dias depois os gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, e culturas linfocitárias estabelecidas *in vitro* na presença do péptido imunizador. Ao fim de 4 dias em cultura, 4×10^7 células foram transferidas por via endovenosa para ratinhos SJL/J *naive* (n=5) e os animais seguidos clinicamente para observação de sinais de doença clínica. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão da pontuação EAE diária.

Quatro dias depois da administração das linhas celulares anti-Nogo, os animais recipientes em ambos os grupos evidenciaram uma melhoria significativa da sua situação clínica (Figura 38A). A redução da pontuação foi sobretudo evidente no grupo ao qual foram administradas células anti-Nogo45-66, e manteve-se nos 45 dias seguintes até ao final da experiência, 30 dias após a última transferência de células. Neste grupo houve diferenças estatisticamente significativas de pontuação EAE com o grupo controlo começando 3 dias após a primeira transferência – consistente com o tempo

de tráfego celular entre a periferia e o SNC reconhecido na literatura - (Figura 38B), e mantendo-se durante os 13 dias seguintes. Ao longo deste período, houve 7 dias com valores estatisticamente significativos com valores $p < 0.05$ (pontuação PBS dia 35 e 36 de 2.44 ± 0.72 , dia 37 2.78 ± 0.97 e dia 38 2.56 ± 0.88 contra pontuação Nogo45-66 1.40 ± 0.96 durante o mesmo período, com valores p respectivos de 0.035, 0.035, 0.013 e 0.028 ; pontuação PBS 2.67 ± 0.86 dia 41 contra pontuação Nogo45-66 1.60 ± 0.96 , valor $p = 0.035$; pontuação PBS 2.78 ± 0.13 dia 45 contra pontuação Nogo45-66 1.50 ± 0.03 , valor $p = 0.035$) (asteriscos na figura 38B). No que diz respeito ao grupo Nogo1-22, o efeito foi mais temporário, chegando a significância estatística a $p < 0.05$ em apenas um dia durante o mesmo período (pontuação PBS 2.78 ± 0.97 dia 37 contra pontuação Nogo1-22 1.60 ± 0.96 , valor $p = 0.043$), com 4 dias com $p < 0.1$ (Figura 38B). Quase imediatamente após a última transferência, os valores da pontuação clínica sofreram um agravamento,



embora nunca chegassem a atingir o valor do controle com PBS.

Figura 38A. Tratamento de EAE induzida com PLP139-151 em ratinhos SJL/J pela transferência de linhas celulares anti-Nogo. Induzimos EAE em ratinhos SJL/J com PLP139-151 em ACF (100 $\mu\text{g}/\text{animal}/\text{s.c.}$); no pico do segundo surto, os animais foram randomizados em três grupos e receberam PBS ($n=9$; Δ , linha pontilhada), células T anti-Nogo1-22 ($n=10$; \square , linha sólida) ou anti-Nogo45-66 ($n=10$; \blacktriangle , linha sólida). Cada animal recebeu três injeções endovenosas contendo 1.5×10^7 T células em PBS com intervalos de 1 semana, durante 3 semanas (setas). Os asteriscos negros representam diferenças estatisticamente significativas de pontuação clínica ($p < 0.05$ Mann-Whitney) entre os grupos Nogo45-66 ou Nogo 1-22 e o controle PBS. A pontuação final no dia 76 não atingiu significância estatística, com valor Mann-Whitney $p = 0.053$ (pontuação PBS 3 ± 1.5 , Nogo1-22

2.3±1.05, Nogo45-66 1.6±1.07). Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão da pontuação EAE diária.

	11	12	13	14	15	16	17
Nogo1-22 vs PBS	1,000	0,549	0,842	0,780	0,780	0,497	0,905
Nogo45-66 vs PBS	1,000	0,497	0,842	0,604	0,780	0,905	0,842
	18	19	20	21	22	23	24
Nogo1-22 vs PBS	0,968	0,661	0,842	0,842	0,842	0,842	0,780
Nogo45-66 vs PBS	0,968	0,497	0,905	0,905	0,780	1,000	0,905
	25	26	27	28	29	30	31
Nogo1-22 vs PBS	0,780	0,842	0,842	0,720	0,720	0,905	0,604
Nogo45-66 vs PBS	0,604	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720	0,780
	32	33	34	35	36	37	38
Nogo1-22 vs PBS	0,842	0,497	0,720	0,243	0,356	0,043	0,182
Nogo45-66 vs PBS	0,610	0,497	0,720	0,035	0,035	0,013	0,028
	39	40	41	42	43	44	45
Nogo1-22 vs PBS	0,053	0,095	0,156	0,095	0,095	0,211	0,133
Nogo45-66 vs PBS	0,065	0,053	0,035	0,065	0,065	0,079	0,035
	46	47	48	49	50	51	52
Nogo1-22 vs PBS	0,211	0,549	0,780	0,720	0,720	0,968	0,905
Nogo45-66 vs PBS	0,043	0,095	0,211	0,211	0,133	0,133	0,133
	53	54	55	56	57	58	59
Nogo1-22 vs PBS	0,842	0,905	0,447	0,604	0,720	0,604	0,400
Nogo45-66 vs PBS	0,211	0,211	0,113	0,182	0,182	0,156	0,113
	60	61	62	63	64	65	66
Nogo1-22 vs PBS	0,400	0,315	0,356	0,356	0,243	0,447	0,400
Nogo45-66 vs PBS	0,182	0,095	0,053	0,095	0,053	0,079	0,211
	67	68	69	70	71	72	73
Nogo1-22 vs PBS	0,497	0,400	0,447	0,356	0,243	0,604	0,604
Nogo45-66 vs PBS	0,156	0,079	0,065	0,113	0,095	0,065	0,065
	74	75	76				
Nogo1-22 vs PBS	0,604	0,447	0,356				

Figura 38B. Comparação entre as pontuações de grupos de ratinhos SJL/J tratados com transferência adoptiva de linhas celulares anti-Nogo1-22 (n=10), anti-Nogo45-66 (n=10) ou PBS (n=9). Resultados (valor p) do teste de significância estatística Mann-Whitney para amostras emparelhadas. Assinalados a laranja dias com p<0.10, e a amarelo dias com p<0.05.

No final desta experiência, avaliámos a presença de linfócitos T à periferia, reactivos contra os péptidos PLP139-151, Nogo1-22 e Nogo45-66, através de ensaios de proliferação. Como se pode observar dos resultados desta experiência (Figura 39), foi possível detectar a presença de linfócitos reactivos contra o péptido indutor PLP139-151, mas também as células anti-Nogo administradas anteriormente, sobretudo para a linha Nogo45-66. Neste caso, a proliferação contra este péptido foi muito superior à encontrada contra o péptido indutor, sugerindo que possa haver supressão cruzada entre os linfócitos anti-Nogo45-66 e anti-PLP139-151. A análise histopatológica do SNC de animais de todos os grupos utilizados nesta

experiência de transferência adoptiva, para a determinação da carga lesional desmielinizante e inflamatória, revelou uma redução do número de lesões meníngeas e parenquimatosas em ambos os grupos que receberam transferências de células, em comparação com o grupo de controlo; esta redução foi sobretudo evidente para o grupo Nogo45-66 e à custa do número de lesões parenquimatosas. Dado o pequeno número de animais utilizados, os resultados não chegam a ter significância estatística, mas parecem demonstrar a mesma tendência que as pontuações clínicas (PBS>Nogo1-22>Nogo45-66) (Figura 40), *i.e.* que a administração de linhas celulares anti-Nogo reduz a gravidade clínica e histológica da EAE induzida com PLP139-151.

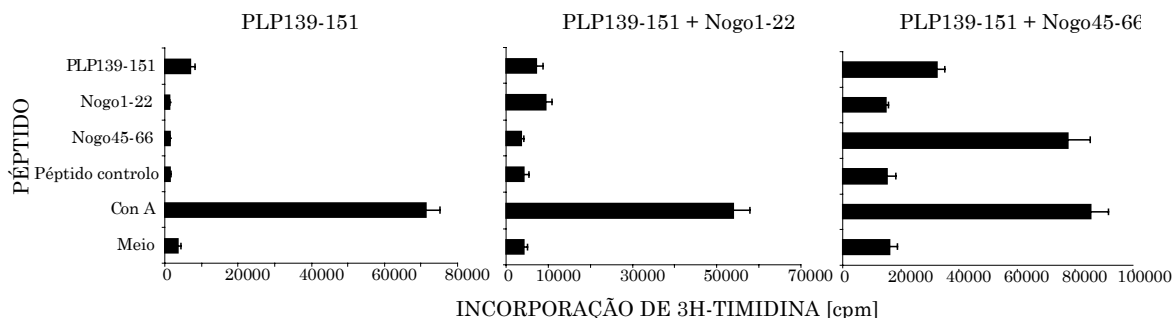


Figura 39. Demonstração da presença de linhas celulares anti-Nogo em ratinhos SJL/J com EAE induzida por imunização com PLP139-151 em ACF e tratados por transferência adoptiva de linhas celulares anti-Nogo. No final da experiência, os gânglios linfáticos axilares e inguinais foram dissecados, culturas celulares linfocitárias estabelecidas e a capacidade proliferativa testada contra um painel de péptidos, incluindo o péptido imunizador (PLP139-151), péptidos Nogo (1-22 e 45-66), peptido controlo (Vβ5.1) e concanavalina A (con A). Todos os péptidos a 20µg/ml, concanavalina A a 5µg/ml. Os resultados mostrados são contagens médias por minuto (cpm) ± DP de amostras triplicadas.

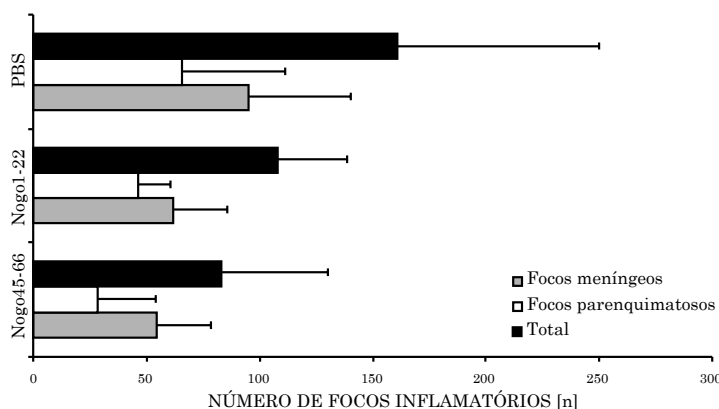


Figura 40. Avaliação neuropatológica da carga lesional no SNC. No final da experiência anterior, os ratinhos foram sacrificados, perfundidos com formalina a 10% e o encéfalo retirado, fixado e incluído em parafina. Análise semiquantitativa do número de focos inflamatórios em cortes microscópicos no SNC de ratinhos SJL/J com EAE

induzida com PLP139-151 (100 µg/animal/s.c.) e tratados por transferência adoptiva de

linhas celulares anti-Nogo1-22, anti-Nogo45-66 ou PBS (PNB n=3, Nogo1-22 n=5, Nogo45-66 n=5). Os resultados mostrados são a média do número de lesões observadas \pm desvio padrão.

Na tentativa de avaliar de outra forma a severidade das lesões inflamatórias locais, isolámos o encéfalo e a medula espinhal dos restantes animais de todos os grupos utilizados para esta experiência, e extraímos ARN total (de amostras agrupadas) a partir do qual sintetizámos cADN de primeira cadeia, utilizando *primers* oligo-dT de forma a traduzir apenas ARN mensageiro (ARNm). A análise do ARNm presente no SNC foi feita através de RPC quantitativa utilizando *primers* para CD3 ζ (medida do número de linfócitos presente), IFN γ e IL-10. Todos os resultados foram normalizados com base na quantidade de mensagem de β -actina detectada (*gene housekeeping*). As dificuldades de interpretação dos resultados obtidos por esta técnica advêm não só do facto de que se está a quantificar ARNm total, proveniente de várias fontes potenciais, mas também de que a relação destes valores com o *status* clínico é muito difícil, dada a complexidade da resposta imune, e o papel que qualquer uma destas citocinas pode representar a determinada altura. A comparação dos resultados entre os três grupos (Figura 41) revela uma redução da mensagem de CD3 ζ no grupo Nogo45-66, quer no encéfalo, quer na medula espinhal, correspondendo provavelmente à menor quantidade de infiltrados inflamatórios nestes animais, ou expresso de outra forma, à redução do número de linfócitos T efectores no SNC. No que diz respeito à mensagem para as citocinas IFN γ e IL-10, há um padrão de redução gradual consistente com o encontrado na clínica e patologia para a primeira, com valores mais reduzidos de IFN γ na medula e encéfalo de animais nos grupos Nogo1-22, e ainda menos no grupo Nogo45-66. Os valores encontrados para a IL-10 são menos característicos, tendo sido encontrado um valor mais elevado na medula de ratinhos no grupo controlo, e menores sobretudo no grupo Nogo45-66.

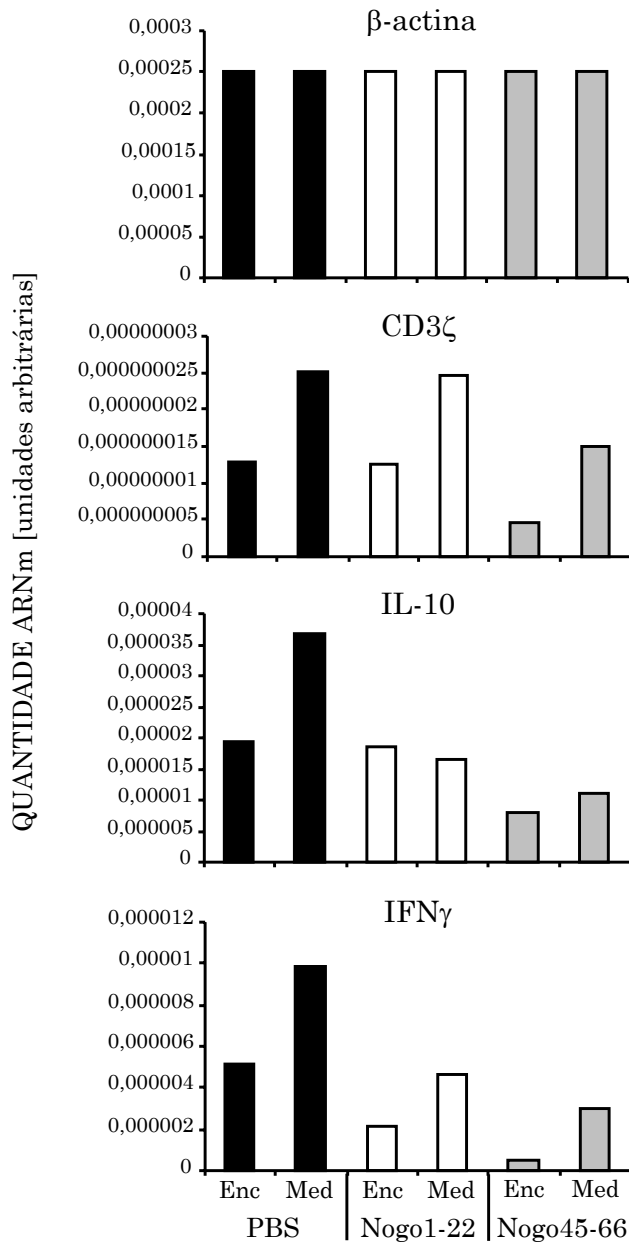


Figura 41. Quantificação da resposta inflamatória no Sistema Nervoso Central por análise de expressão genómica. Quantificação de cDNA de actina, CD3 ζ , IL-10 e IFN γ sintetizado a partir de ARN total extraído do encéfalo (Enc) e medula espinhal (Med) de ratinhos SJL/J com EAE induzida com PLP139-151 e tratados por transferência adoptiva de linhas celulares anti-Nogo1-22, Nogo45-66, ou controlo (PBS). ARN total foi extraído do encéfalo e da medula espinhal de ratinhos agrupados segundo o tratamento (PBS n=4, Nogo1-22 n=5, Nogo45-66 n=5), e cADN sintetizado a partir de 2 μ g de ARN total, utilizando uma estratégia oligo-dT. A presença de β -actina, CD3 ζ , IL-10 e IFN γ foi analisada através de RPC quantitativa; os resultados finais foram modificados com base na normalização para a quantidade de actina presente, de forma a corrigir as variações de amostragem de ARNm total. Os resultados são a média de 3 amostras de ADNc para cada condição expressos em unidades arbitrárias.

De forma a demonstrar que os linfócitos anti-Nogo transferidos adoptivamente tinham a capacidade de penetrar no SNC de ratinhos com EAE, utilizámos uma estirpe congénica de ratinhos SJL/J, que exprime uma versão (Thy1.1a) da molécula CD90 diferente da encontrada na estirpe

SJL/J *wildtype* (Thy1.2)^f. Imunizámos estes ratinhos congénicos com PLP139-151, Nogo1-22 ou Nogo45-66, e, dez dias depois, retirámos os gânglios linfáticos de drenagem, estabelecendo culturas linfocitárias que foram re-estimuladas *in vitro* com o seu péptido cognato. Estas linhas celulares foram administradas por via endovenosa (1×10^7 células/animal) a ratinhos SJL/J Thy1.2 que haviam sido induzidos com EAE utilizando PLP139-151 e estavam no pico da doença; três dias mais tarde, os animais recipientes foram sacrificados, o SNC retirado e a presença das linhas celulares anti-PLP e anti-Nogo confirmada por imunohistoquímica com anticorpos anti-Thy1.1a. Desta forma, pudemos demonstrar a presença de células transferidas pertencentes a todos os grupos nos vasos, infiltrados perivascularares e parênquima dos animais recipientes, não sendo discernível qualquer diferença de comportamento entre células anti-PLP e células anti-Nogo (Figura 42). Estes resultados indicam que células reactivas contra os péptidos Nogo têm a capacidade de migrar para o SNC de animais com EAE activa, onde poderão eventualmente modular a doença, localmente, actuando nos focos inflamatórios, através de vários processos como a supressão cruzada ou a secreção de citocinas.

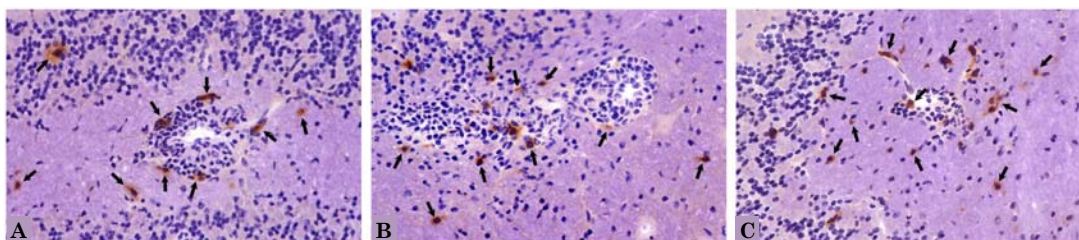


Figura 42. As linhas celulares anti-Nogo penetram no parenquima de ratinhos SJL/J com EAE induzida com PLP139-151. Induzimos EAE em ratinhos SJL/J naive (Thy1.2) com PLP139-151 (100 mg/animal/s.c.) em ACF. Ratinhos congénicos Thy1.1a foram imunizados com PLP139-151, Nogo1-22 e Nogo45-66; ao fim de 10 dias, os seus gânglios linfáticos de drenagem foram dissecados, culturas celulares estabelecidas e estimuladas *in vitro* com o péptido respectivo durante 4 dias, após o que 1×10^7 células foram injectadas e.v. em ratinhos SJL/J com EAE. Os animais foram sacrificados 3 dias depois da transferência celular, o seu encéfalo retirado, congelado e incluído a fresco para imunohistoquímica. Células Thy1.1a (setas) foram detectadas nos espaços perivascularares e penetrando no parênquima encefálico de ratinhos com EAE que receberam células estimuladas com PLP139-151 (A), Nogo1-22 (B) ou Nogo45-66 (C).

^f Aproveitamos a oportunidade para agradecer ao Dr. Harley Y. TSE da Universidade Wayne State (Detroit, MI) pela doação dos ratinhos SJL/J Thy1.1a utilizados nestas experiências.

9. Mapeamento dos epítomos dominantes dos péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66 para a resposta linfocitária T na estirpe SJL/J através de ensaios de proliferação.

Pretendendo melhorar a reacção imune contra os epítomos celulares T detectados para a estirpe SJL/J (péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66), propusemo-nos determinar a sequência antigénica dominante dentro de cada um dos mesmos. De forma a realizar o mapeamento de epítomos para esta estirpe, sintetizámos péptidos de sequência sobreposta cobrindo as sequências Nogo1-22 e Nogo45-66 (Figura 43), e testámos a capacidade proliferativa de linhas celulares T obtidas a partir de ratinhos SJL/J *naive* imunizados com os péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66.

Nogo 1-66	RIYKGVIAIQKSDEGHPPFRAYLESEVAISEELVQKYSNSALGHVNSTIKELRRLFLVDDLVDLSLK
Nogo 1-22	RIYKGVIAIQKSDEGHPPFRAY
Nogo 1-12	RIYKGVIAIQK
Nogo 1-14	RIYKGVIAIQKSD
Nogo 1-16	RIYKGVIAIQKSDEG
Nogo 2-15	IYKGVIAIQKSDE
Nogo 2-17	IYKGVIAIQKSDEGH
Nogo 3-16	YKGVIAIQKSDEG
Nogo 3-19	YKGVIAIQKSDEGHPP
Nogo 4-20	KGVIQAIQKSDEGHPPFR
Nogo 4-24	KGVIQAIQKSDEGHPPFRAYLE
Nogo 7-18	IQAIQKSDEGHPP
Nogo 7-21	IQAIQKSDEGHPPFR
Nogo 7-24	IQAIQKSDEGHPPFRAYLE
Nogo 10-24	IQKSDEGHPPFRAYLE
Nogo 13-24	SDEGHPPFRAYLE
Nogo 16-24	GHPFRAYLE
Nogo 23-44	LESEVAISEELVQKYSNSALGH
Nogo 45-66	VNSTIKELRRLFLVDDLVDLSLK
Nogo 48-66	TIKELRRLFLVDDLVDLSLK
Nogo 48-57	TIKELRRLFL
Nogo 49-63	IKELRRLFLVDDLVD
Nogo 49-58	IKELRRLFLVDD
Nogo 49-59	IKELRRLFLVD
Nogo 50-63	KELRRLFLVDDLVD
Nogo 51-63	ELRRLFLVDDLVD
Nogo 51-66	ELRRLFLVDDLVDLSLK
Nogo 57-66	LVDDLVDLSLK

Figura 43. Lista de péptidos Nogo utilizados para o mapeamento de epítomos dentro dos péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66 para a estirpe SJL/J. Para cada péptido, a sua sequência N-terminus para C-terminus está discriminada; os péptidos Nogo1-22, Nogo23-44 e Nogo45-66 estão assinalados a cor (vermelho, amarelo e roxo, respectivamente).

Começando a eliminar AA a partir do *terminus* amino, no que diz respeito à proliferação da linha Nogo1-22, observámos uma redução apreciável da capacidade proliferativa a partir do AA na sétima posição

(péptido Nogo7-24), com alguma redução sendo já observável a partir do AA da primeira posição (passagem do péptido Nogo1-24 para 4-24, e deste para o 7-24). Realizando uma operação idêntica de redução progressiva do *terminus* amino para a sequência Nogo45-66, a capacidade proliferativa reduz-se nitidamente a partir do AA na quadragésima oitava posição (péptido Nogo48-66), e é eliminada a partir do AA na quinquagésima sétima (péptido Nogo57-66). Posteriormente, após identificação do *terminus* amino provável para cada epítipo, testámos a capacidade proliferativa contra péptidos de sequência sobreposta para identificar o *terminus* carboxi. Tentámos, igualmente, identificar o determinante antigénico da sequência Nogo1-22 para a estirpe C57BL/6, utilizando a mesma colecção de péptidos sintetizados. Após isolamento de linhas linfocitárias T anti-Nogo1-22 (SJL/J e C57BL/6) e anti-Nogo45-66 (SJL/J), foram realizados ensaios de proliferação *in vitro*, tal como anteriormente descrito. Os resultados encontrados permitiram-nos identificar, de forma provisória, as regiões antigénicas prováveis, dentro de cada um destes dois péptidos, para as duas estirpes testadas. Assim, para a estirpe SJL/J, a sequência peptídica mínima que continua a estimular uma resposta linfocitária T encontra-se dentro da região Nogo3-16 e, tendo em conta que a sequência 7-18 é, ainda, antigénica, o epítipo deve localizar-se aos resíduos Nogo7-16 (Figura 44). Para a estirpe C57BL/6, o determinante antigénico parece localizar-se mais para o *terminus* amino, provavelmente nos resíduos 3-12, uma vez que os péptidos Nogo1-12 e Nogo3-16 são estimuladores da proliferação (Figura 44). Por último, a região Nogo45-66 contém um determinante antigénico que está contido entre os resíduos 49 e 63, provavelmente na sequência 49-59 (Figura 44).

	SJL/J	C57BL/6		SJL/J
Nogo 1-22	+++	+++	Nogo 45-66	+++
Nogo 1-12	-	+	Nogo 48-66	+++
Nogo 1-14	-	++	Nogo 48-57	+
Nogo 1-16	-/+	++	Nogo 49-63	++
Nogo 2-15	+	++	Nogo 49-61	+
Nogo 2-17	+	++	Nogo 49-59	+
Nogo 3-16	++	+	Nogo 49-58	+/-
Nogo 3-19	++	+	Nogo 50-63	-
Nogo 4-20	++	-	Nogo 51-63	-
Nogo 4-24	++	-	Nogo 51-66	-
Nogo 7-18	+	-	Nogo 57-66	-
Nogo 7-21	+	-		
Nogo 7-24	+	-		
Nogo 10-24	-	-		
Nogo 13-24	-	-		
Nogo 16-24	-	-		

Figura 44. Ensaio de proliferação para mapeamento de determinantes antigênicos nas regiões Nogo1-22 e Nogo45-66. Ratinhos SJL/J e C57BL/6 foram imunizados, na região plantar das patas traseiras, com emulsões dos péptidos Nogo1-22 e Nogo45-66 (100 µg/injecção em cada pata); dez dias depois, foram retirados os gânglios popliteus e inguinais, e estabelecidas linhas celulares T *in vitro*. A proliferação destas linhas (0.25x10⁶ células/ml) foi testada contra um painel de péptidos Nogo (100 µM/condição), péptido controlo (Vβ5.1, 100 µM) e concanavalina A (2.5 mg/ml). Os resultados são expressos sob a forma de escala semiquantitativa em que + significa proliferação (desde +++ a +), e – significa ausência de proliferação acima do controlo negativo.

Estes resultados são, naturalmente, preliminares, e a sua confirmação aguarda a realização de ensaios de proliferação para detecção de respostas linfocitárias T, realizados após imunização *in vivo* com estas sequências antigénicas mínimas, em ambas as estirpes. Por outro lado, deverão ser realizados ensaios de proliferação, com sequências peptídicas modificadas por substituições de alanina para cada posição, de forma a caracterizar os resíduos chave para a apresentação no MHC e o reconhecimento por TCR. Por último, será, igualmente, interessante, verificar se a imunização com estes novos epítomos resulta numa maior eficácia de indução de EAE nestas estirpes.

10. Construção de vacinas de ADN a partir das sequências de ADN para a proteína Nogo.

Dado o interesse eventual em realizar ensaios de prevenção e tratamento na EAE, mas também em modelos animais de trauma medular, onde o bloqueio da acção inibitória do sistema Nogo-receptor Nogo pode ter implicações terapêuticas importantes para a regeneração pós-trauma, decidimos sintetizar vacinas de ADN correspondendo às regiões, com capacidade inibitória, presentes na proteína Nogo. Tal como foi, anteriormente, descrito em relação ao modo de acção das vacinas com ADN, a indução de uma resposta imune contra esta proteína poderia assumir importância quer por bloquear a sua acção inibitória (através da indução de anticorpos contra esta proteína), quer, na sua nova capacidade de autoantígeno, por modular a resposta imune dentro do contexto de fenómenos de desmielinização autoimune.

De forma construir vacinas de ADN contra estes alvos antigénicos, seleccionámos *primers* específicos de sequência para amplificar a região contendo os péptidos Nogo623-640 (denominada, a partir deste ponto, por sequência A) e Nogo-66 (denominada sequência B). Baseamo-nos, para tal, na sequência disponível, na altura, para o gene Nogo-A no humano e no rato – a sequência para o ratinho não se encontrava disponível na altura que este trabalho foi realizado (Figura 45). Numa segunda fase, fizemos RPC com *primers* específicos para amplificar a sequência Nogo623-640 e Nogo-66 a partir das sequências A e B anteriormente clonadas (estratégia de RPC *nested*). Em ambos os casos, desenhámos os *primers* para incluir na extremidade 5' do amplicão a sequência de consenso KOZAK (28, 29) (GCCGCC) e o codão de iniciação para transcrição proteica (ATG), e na extremidade 3' o codão de paragem de transcrição (TAG) bem como um local de reconhecimento para enzimas de restrição (XhoI ou BamH1 conforme os casos). Como *template* para amplificação, usámos colecções de ADNc extraído de cérebro humano e de rato. Os produtos da RPC foram de seguida

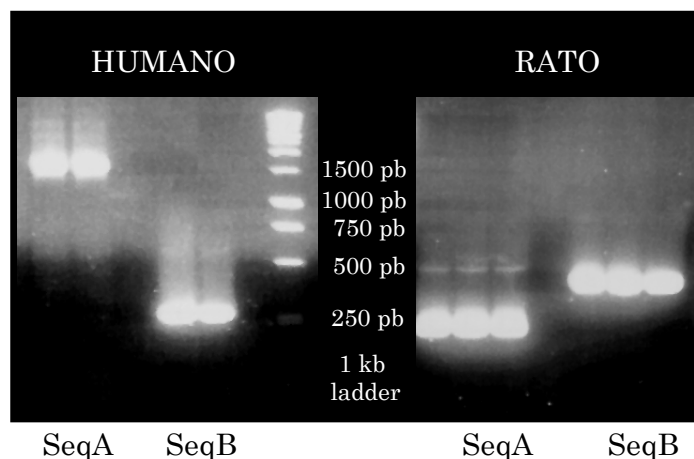


Figura 45. Clonagem de vacinas de ADN anti-Nogo. Reacção de polimerização em cadeia para as regiões contendo o péptido Nogo623-640 (sequência A, SeqA) e Nogo-66 (sequência B, SeqB) a partir de ADNc de encéfalo humano e de rato. Imagens de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, na presença de escada de ADN 1Kb. A RPC foi realizada utilizando uma estratégia *touchdown* e *primers* específicos de sequência para o gene *nogo* humano e de rato. Tamanho do produto previsto para a sequência A humana 1474 pb; sequência B humana 268 pb; sequência A rato 240 pb; sequência B rato 438 pb (pb=par de bases).

clonados no vector de expressão pTargeT, conforme descrito no Capítulo VI. A identificação de clones bacterianos com a sequência de ADN correcta foi feita após ensaios por digestão com enzima de restrição e análise em gel de agarose para confirmação da presença do constructo (Figura 45), seguida de sequenciação automática dos clones contendo uma sequência inserida do tamanho correcto (Figura 46). De seguida, utilizando uma estratégia de *primers* degenerados, procurámos amplificar a partir de ADNc de cérebro de ratinho as sequências A e B homólogas da proteína Nogo-A, na altura desconhecidas (Figura 47); obtivemos, assim, sequências de ADN para esta espécie correspondendo, eventualmente, às regiões pretendidas da proteína Nogo-A, e que foram clonadas e sequenciadas tal como anteriormente descrito. A análise de homologia entre as sequências obtidas por esta estratégia e as disponíveis para o humano e rato (Figura 47) revelou um grau de homologia muito elevado para ambas as regiões entre estas três espécies. Entre a sequência de ratinho e rato há apenas uma diferença de 7 pares de bases na sequência para Nogo623-640 (7,29% do total) e de 8 pares de bases para a sequência Nogo-66 (4,04% do total); entre a sequência de ratinho e humano, e entre rato e humano, 15 (15,62%) e 14 (7,07%) pares de

bases de diferença, respectivamente. Em termos da sequência previsível de AA traduzida a partir do ADN clonado, as diferenças são ainda menos significativas para o péptido Nogo-66, cuja sequência é idêntica entre ratinho e rato, com apenas 1 AA diferente para a proteína humana (na região Nogo45-50 VNCTIK em vez de VNSTIK para ambas as espécies murinas). O péptido Nogo623-640 tem menor grau de homologia, existindo 3 AA de diferença entre as espécies (NYESIKHE no humano contra SYDSIKLE no rato e ratinho).

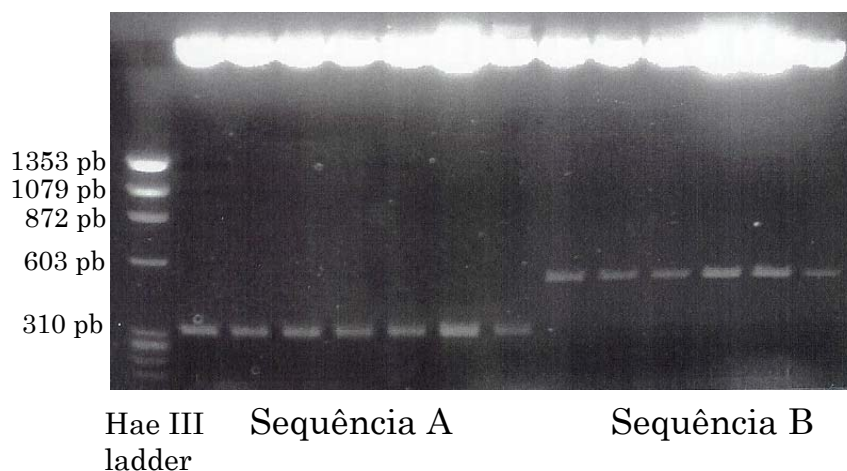


Figura 45. Clonagem de vacinas de ADN anti-Nogo. Confirmação da presença de constructos de ADN em clones bacterianos através de reacções de digestão enzimática com enzimas de restrição. Imagem de gel de agarose a 1.5% corado com brometo de etídio na presença de escada de ADN Φ X174/*Hae* III, para o produto de reacção de digestão com a enzima de restrição Eco RI do vector pTarget com os constructos Sequência A e Sequência B do gene Nogo-A de ratinho.

```

1
16A•NG66.1  TTCC-TTCCA TCCTGCTAG CCTCGAGACG CGTGATTTCG CGCCATGAGG ATATACAAGG GTGTGATCCA AGCTATCCAG AAATCAGATG AAGGCCACCC ATTCAGGGCA TATCTGGAAT CTGAAGTTGC
18A•NG66.1  CGATTCCA TCCTGCTAG CCTCGAGACG CGTGATTTCG CGCCATGAGG ATATACAAGG GTGTGATCCA AGCTATCCAG AAATCAGATG AAGGCCACCC ATTCAGGGCA TATCTGGAAT CTGAAGTTGC
17A•NG66.6  CTCC AGCCTAGACG CGTGATTTCG CGCCATGAGG ATATACAAGG GTGTGATCCA AGCTATCCAG AAATCAGATG AAGGCCACCC ATTCAGGGCA TATCTGGAAT CTGAAGTTGC
hNogo-66    AGG ATATACAAGG GTGTGATCCA AGCTATCCAG AAATCAGATG AAGGCCACCC ATTCAGGGCA TATCTGGAAT CTGAAGTTGC
Consensus   .....ct.g...c.agacy cgtgatttgc cgccatgagg ATATACAAGG GTGTGATCCA AGCTATCCAG AAATCAGATG AAGGCCACCC ATTCAGGGCA TATCTGGAAT CTGAAGTTGC

131
16A•NG66.1  TATATCTGAG GAGTTGGTTC AGAAGTACAG TAATTCTGCT CTTGGTCATG TGAAGTGCAC GATAAAGGAA CTCAGGCGCC TCTCTTAGT TGATGATTGA GTTGATTCTC TGAAGTTTGC AGTGTGTGATG
18A•NG66.1  TATATCTGAG GAGTTGGTTC AGAAGTACAG TAATTCTGCT CTTGGTCATG TGAAGTGCAC GATAAAGGAA CTCAGGCGCC TCTCTTAGT TGATGATTGA GTTGATTCTC TGAAGTTTGC AGTGTGTGATG
17A•NG66.6  TATATCTGAG GAGTTGGTTC AGAAGTACAG TAATTCTGCT CTTGGTCATG TGAAGTGCAC GATAAAGGAA CTCAGGCGCC TCTCTTAGT TGATGATTGA GTTGATTCTC TGAAGTTTGC AGTGTGTGATG
hNogo-66    TATATCTGAG GAGTTGGTTC AGAAGTACAG TAATTCTGCT CTTGGTCATG TGAAGTGCAC GATAAAGGAA CTCAGGCGCC TCTCTTAGT TGATGATTGA GTTGATTCTC TGAAGTTTGC AGTGTGTGATG
Consensus   TATATCTGAG GAGTTGGTTC AGAAGTACAG TAATTCTGCT CTTGGTCATG TGAAGTGCAC GATAAAGGAA CTCAGGCGCC TCTCTTAGT TGATGATTGA GTTGATTCTC TGAAGTTTGC AGTGTGTGATG

```

Figura 46. Sequenciação do constructo Nogo-66 humano clonado para vacina de ADN. Exemplo de sequenciação do constructo hNogo-66 alinhado com a sequência Nogo-66 proveniente da *GenBank*. Mostrados os resultados de três clones individuais (16A.NG66.1; 18A.NG66.1; 17A.NG66.6) sobrepostos à sequência correcta (hNogo-66). A vermelho os pares de bases idênticos em todos, a azul os pares de bases idênticos apenas em dois ou mais clones. Sequência de consenso mostrada na fila inferior. Note-se a presença da sequência GCCGCCATG na extremidade 5' dos clones contendo o codão de iniciação de transcrição e a sequência KOZAK.

Ratinho	CCACTAGAAGTACCGTCTCCAGTTACTTATGACGGTATAAAGCTTGAGCCTGAAAATC
Rato	CCACTGGAAGCACCTCCTCCAGTTACTTATGACAGTATAAAGCTTGAGCCTGAAAACC
Humano	CCATTAGAAGC---TTCTTCAGTTAATTATGAAAGCATAAAACATGAGCCTGAAAACC
Ratinho	CCCCACCATATGAAGAAGCCATGACTGTAGCACTAAAA
Rato	CCCCACCATATGAAGAAGCCATGAATGTAGCACTAAAA
Humano	CCCCACCATATGAAGAGGCCATGACTGTATCACTAAAA
Ratinho	AGGATATATAAGGGTGTGATCCAAGCTATCCAGAAATCAGATGAAGGCCACCCATTCA
Rato	AGGATATATAAGGGCGTGATCCAGCTATCCAGAAATCAGATGAAGGCCACCCATTCA
Humano	AGGATATACAAGGGTGTGATCCAAGCTATCCAGAAATCAGATGAAGGCCACCCATTCA
Ratinho	GGGCATATTTGGAATCTGAAGTTGCCATATCAGAGGAATTGGTTCAGAAATATAGTAA
Rato	GGGCATATTTAGAATCTGAAGTTGCTATATCAGAGGAATTGGTTCAGAAATACAGTAA
Humano	GGGCATATCTGGAATCTGAAGTTGCTATATCTGAGGAGTTGGTTCAGAAAGTACAGTAA
Ratinho	TTCTGCTCTTGGTCATGTGAACAGCACAAATAAAGAATTGAGGCGTCTCTTCTTAGTT
Rato	TTCTGCTCTTGGTCATGTGAACAGCACAAATAAAGAAGCTGAGGCGGCTTTTCTTAGTT
Humano	TTCTGCTCTTGGTCATGTGAAGTGCACGATAAAGGAAGCTCAGGCGCCTCTTCTTAGTT
Ratinho	GATGATTTAGTTGATTCCCTGAAG
Rato	GATGATTTAGTTGATTCCCTGAAG
Humano	GATGATTTAGTTGATTCTCTGAAG

Figura 47. Comparação de homologia entre a sequência de ADN para as proteínas Nogo623-640 (cima) e Nogo-66 (baixo) nas espécies ratinho, rato e humano. Assinaladas a cinzento as bases idênticas nas três espécies, e a negro as identidades entre duas espécies.

As vacinas por nós desenhadas, utilizando o processo acima descrito, estão, neste momento, a ser utilizadas num ensaio terapêutico em modelos experimentais de trauma medular, não fazendo parte, como tal, do objecto desta tese.

11. Bibliografia.

1. Filbin, M.T. 2003. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4:703-713.
2. Berry, M. 1982. Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: an hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian central nervous system. *Bibl Anat*:1-11.
3. Fontoura, P., and L. Steinman. 2006. Nogo in multiple sclerosis: growing roles of a growth inhibitor. *J Neurol Sci* 245:201-210.
4. Domeniconi, M., and M.T. Filbin. 2005. Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration. *J Neurol Sci* 233:43-47.
5. Trapp, B.D., J. Peterson, R.M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork, and L. Bo. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338:278-285.
6. Lassmann, H. 2003. Axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:695-697.
7. Bjartmar, C., J.R. Wujek, and B.D. Trapp. 2003. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 206:165-171.

8. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
9. Schwartz, M., and J. Kipnis. 2005. Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 233:163-166.
10. Schwartz, M. 2001. Protective autoimmunity as a T-cell response to central nervous system trauma: prospects for therapeutic vaccines. *Prog Neurobiol* 65:489-496.
11. Hauben, E., A. Ibarra, T. Mizrahi, R. Barouch, E. Agranov, and M. Schwartz. 2001. Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal-cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15173-15178.
12. Huang, D.W., L. McKerracher, P.E. Braun, and S. David. 1999. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24:639-647.
13. Merkler, D., T. Oertle, A. Buss, D.D. Pinschewer, L. Schnell, F.M. Bareyre, M. Kerschensteiner, B.S. Buddeberg, and M.E. Schwab. 2003. Rapid induction of autoantibodies against Nogo-A and MOG in the absence of an encephalitogenic T cell response: implication for immunotherapeutic approaches in neurological diseases. *Faseb J* 17:2275-2277.
14. Sicotte, M., O. Tsatas, S.Y. Jeong, C.Q. Cai, Z. He, and S. David. 2003. Immunization with myelin or recombinant Nogo-66/MAG in alum promotes axon regeneration and sprouting after corticospinal tract lesions in the spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 23:251-263.
15. Furlan, R., E. Brambilla, F. Sanvito, L. Roccatagliata, S. Olivieri, A. Bergami, S. Pluchino, A. Uccelli, G. Comi, and G. Martino. 2003. Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Brain* 126:285-291.
16. Zheng, B., C. Ho, S. Li, H. Keirstead, O. Steward, and M. Tessier-Lavigne. 2003. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38:213-224.
17. Karnezis, T., W. Mandemakers, J.L. McQualter, B. Zheng, P.P. Ho, K.A. Jordan, B.M. Murray, B. Barres, M. Tessier-Lavigne, and C.C. Bernard. 2004. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* 7:736-744.
18. Li, M., J. Shi, Z. Wei, F.Y. Teng, B.L. Tang, and J. Song. 2004. Structural characterization of the human Nogo-A functional domains. Solution structure of Nogo-40, a Nogo-66 receptor antagonist enhancing injured spinal cord regeneration. *Eur J Biochem* 271:3512-3522.
19. Kyte, J., and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* 157:105-132.
20. Zimmerman, J.M., N. Eliezer, and R. Simha. 1968. The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods. *J Theor Biol* 21:170-201.
21. Fraga, S. 1982. Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Canadian Journal of Chemistry* 60:2606-2610.
22. Altschul, S.F. 1991. Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. *J Mol Biol* 219:555-565.
23. Altschul, S.F., M.S. Boguski, W. Gish, and J.C. Wootton. 1994. Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet* 6:119-129.
24. Dayhoff, M.O., R.M. Schwartz, and B.C. Orcutt. 1978. A model of evolutionary change in proteins. *Atlas of protein sequence and structure* 5:345-352.
25. Henikoff, S., and J.G. Henikoff. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10915-10919.
26. Robinson, W.H., P. Fontoura, B.J. Lee, H.E. de Vegvar, J. Tom, R. Pedotti, C.D. DiGennaro, D.J. Mitchell, D. Fong, P.P. Ho, P.J. Ruiz, E. Maverakis, D.B. Stevens, C.C. Bernard, R. Martin, V.K. Kuchroo, J.M. van Noort, C.P. Genain, S. Amor, T. Olsson, P.J. Utz, H. Garren, and L. Steinman. 2003. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nature biotechnology* 21:1033-1039.
27. Bell, R.B., J.W. Lindsey, R.A. Sobel, S. Hodgkinson, and L. Steinman. 1993. Diverse T cell receptor V beta gene usage in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 150:4085-4092.
28. Kozak, M. 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic acids research* 12:857-872.
29. Kozak, M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196:947-950.

CAPÍTULO VI

Materiais e Métodos.

Animais. Ratinhos fêmeas das estirpes SJL/J, C57BL/6, Balb/c, DBA/1J, CBA/J, B10.RIII e B10.PL de 6 semanas de idade foram obtidos dos laboratórios Jackson (Bar Harbor, ME). Todos os animais tinham entre 6 e 8 semanas de idade na altura da indução de EAE. Ratinhos mutantes *knockout* Nogo-A/B/C foram gerados conforme descrito por ZHENG *et al.* (1); ratinhos num background H-2b foram gerados por cruzamento entre as estirpes 129S7 e C57BL/6, com 3 de 4 ratinhos cruzados até à homozigotia para estas experiências ((C57BL/6 x 129S7) background N2). Ratinhos SJL/J congénicos Thy1.1a foram uma dádiva de Harley Y. TSE da Universidade Wayne State (Detroit, MI). Ratinhos STAT6 mutantes *knockout* (C.129S2-STAT6^{tm1Gru}) num background Balb/c foram obtidos dos laboratórios Jackson (Bar Harbor, ME). Ratinhos TLR9 *knockout* foram uma dádiva de H. HEMMI da Universidade de Osaka (Osaka, Japão). Ratinhos transgénicos para o TCR AcMBP1-11 num background B10.PL foram uma dádiva do laboratório de C. Garrison FATHMAN da Universidade de Stanford (Palo Alto, CA). Todas as experiências com animais foram executadas de acordo com protocolos revistos e aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da Universidade de Stanford (Palo Alto, CA).

Péptidos. Os péptidos Nogo1-22 (RIYKGVIQAIQKSDEGHPPFRAY), Nogo23-44 (LESEVAISEELVQKYSNSALGH), Nogo45-66 (VNSTIKELRRLFLVDDLVDLSLK), Nogo1044-1063 (LALLSVTISFRIYKGVIQAI), Nogo 1064-1083 (QKSDEGHPPFRAYLESEVAIS), Nogo 1084-1103 (EELVQKYSNSALGHVNSTIK), Nogo 1104-1123 (ELRRLFLVDDLVDLSLKFAVL), Nogo 1-24 (RIYKGVIQAIQKSDEGHPPFRAYLE), Nogo 1-12 (RIYKGVIQAIQK), Nogo 1-14 (RIYKGVIQAIQKSD), Nogo 1-16 (RIYKGVIQAIQKSDEG), Nogo 2-15 (IYKGVIQAIQKSDE), Nogo 2-17 (IYKGVIQAIQKSDEGH), Nogo 3-16 (YKGVIQAIQKSDEG), Nogo 3-19 (YKGVIQAIQKSDEGHPPF), Nogo 4-17 (KGVQAIQKSDEGH), Nogo 4-20 (KGVQAIQKSDEGHPPFR), Nogo 4-24 (KGVQAIQKSDEGHPPFRAYLE), Nogo 7-18 (IQAIQKSDEGHPPF), Nogo 7-21 (IQAIQKSDEGHPPFR), Nogo 7-24 (IQAIQKSDEGHPPFRAYLE), Nogo 10-24 (IQKSDEGHPPFRAYLE), Nogo 13-24 (SDEGHPPFRAYLE), Nogo 16-24 (GHPFRAYLE), Nogo 48-66 (TIKELRRLFLVDDLVDLSLK), Nogo 48-57 (TIKELRRLFL), Nogo

49-63 (IKELRRLFLVDDLVD), Nogo 49-58 (IKELRRLFLVDD), Nogo 49-59 (IKELRRLFLVD), Nogo 50-63 (KELRRLFLVDDLVD), Nogo 51-63 (ELRRLFLVDDLVD), Nogo 51-66 (ELRRLFLVDDLVDLSLK), Nogo 57-66 (LVDDLVDLSLK), proteína proteolipídica (PLP)139-151 (HSLGKWLGHDPKF), proteína proteolipídica (PLP)178-191 (NTWTTCQSIAFPSK), proteína básica de mielina (MBP)59-76 (HTRTTHYGSLPQKSQHGR), proteína básica de mielina (MBP)69-86 (YGSLPQKSQRTQDDENPV) proteína básica de mielina (MBP)85-99 (ENPVVHFFKNIVTPR), proteína básica de mielina (MBP)1-11 acetilada (AcASQKRPSQRSK), glicoproteína oligodendrocitária da mielina (MOG)35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), glicoproteína oligodendrocitária da mielina (MOG)91-106 (DEGGYTCCFRDHSYQ) ovalbumina (OVA)323-339 (RGAENIEAHAAVAQSI), proteína P16 do vírus herpes (HSVP16) (DMTPADALDDRILEM) e cadeia beta do receptor da célula T V β 5.1 (KGERSLKCIPISGHLSVA) foram sintetizados por reacções standard de química 9-fluorenilmetoxycarbonil no nosso laboratório utilizando um sintetizador de péptidos (modelo 9050, MilliGen, Burlington, MA). Todos os péptidos foram purificados por HPLC e a estrutura confirmada por análise de amino ácidos e espectroscopia de massa, e dissolvidos em PBS.

Histologia. Todos os animais foram sacrificados por narcose com CO₂ e perfundidos intra-arterialmente com formalina a 10%, após o qual o cérebro e medula espinhal foram retirados por dissecação. Para técnicas de histologia standard, amostras do SNC foram incluídas em parafina e cortes microscópicos corados com hematoxilina e eosina, Luxol Fast Blue (LFB) e impregnados pela técnica de Bielschowsky para detecção de axónios. Para a análise semiquantitativa, focos inflamatórios meníngeos e parenquimatosos foram contados por um observador cego para o estado clínico e de imunização dos ratinhos. A técnica de imunohistoquímica para detecção do antigénio Thy1.1a foi realizada em amostras de encéfalo colhido a fresco, sem perfusão de formalina, incluídas em Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) e congeladas em azoto líquido por imersão parcial. Cortes congelados de 8 μ m de espessura foram fixados em acetona e corados com

um anticorpo conjugado anti-Thy1.1a biotinilado (BD Pharmingen Cat nº 554893, San Diego, CA) seguido de revelação por complexo de reagente avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA). O produto de reacção foi visualizado com 3.3'-diaminobenzidina (Sigma Cat nº D3939, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e as lâminas coradas com hematoxilina.

Indução de EAE. Nas experiências de prevenção de EAE, os animais experimentais foram induzidos 7-10 dias depois da última administração de ADN, através de imunização com emulsões de péptidos em ACF, conforme descrito abaixo. EAE crónica foi induzida em ratinhos fêmea SJL/J de 6-8 semanas de idade por injeção subcutânea de 100 µg do péptido PLP139-151 dissolvido em PBS e emulsificado com adjuvante completo de FREUND (ACF), consistindo de IFA (Difco, Detroit, MI) e 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (estirpe H37RA; Difco laboratories, Detroit, MI) inactivada por calor. Para indução de EAE crónica em ratinhos C57BL/6 fêmea, os animais foram imunizados com 100 µg/animal do péptido MOG35-55 dissolvido em PBS e emulsificado com ACF e receberam duas injeções endovenosas de toxina de *Bordetella pertussis* (300 ng/animal), na altura da imunização e 48 horas depois. Ratinhos Balb/c e STAT6 knockout foram imunizados com 5 mg de proteína básica de mielina de porquinho-da-índia dissolvida em PBS e emulsificada com ACF. Nas imunizações com péptidos Nogo para indução de EAE em ratinhos SJL/J (H-2s) e C57BL/6 (H-2b), os animais foram injectados subcutaneamente com péptidos Nogo (concentrações testadas entre 100 e 500 microgramas de péptido por injeção) dissolvidos em PBS e emulsificados com ACF. Nas experiências de indução de doença, os animais receberam duas injeções subcutâneas com uma semana de intervalo em locais diferentes (axilar e inguinal); no mesmo dia da segunda injeção, e 48 horas depois, os animais receberam uma injeção endovenosa de toxina de *Bordetella pertussis* (List Laboratories, Campbell, CA) em PBS, 500 nanogramas/animal. Para indução de respostas linfocitárias T e B contra os péptidos Nogo em ratinhos SJL/J (H-2s), C57BL/6 (H-2b), Balb/c (H-2d), B10.PL (H-2u), B10.RIII (H-2r), DBA/1J (H-2q) e CBA/J (H-2k), os animais

foram injectados subcutaneamente com uma dose de 100 µg/péptido/animal subcutaneamente emulsificada em ACF, sem administração de pertussis. Para indução de EAE utilizando co-imunização com péptidos Nogo e MBP85-99, ratinhos fêmea SJL/J foram imunizados com 100 µg/animal de péptido emulsificado em ACF, seguido uma semana depois de nova imunização com a mesma dose de péptido. Na altura da segunda imunização, os animais receberam duas injeções endovenosas de toxina de *Bordetella pertussis* (500 ng/animal). Nos estudos de supressão cruzada entre o péptido MBP85-99 e Nogo1-22, idêntico protocolo de imunização foi utilizado, mas sem administração de PTX. Para indução de EAE em Nogo-A/B/C *knockout* (estirpes NN/- e NC/- e seus controlos respectivos), ratinhos fêmea foram imunizados subcutaneamente com uma emulsão de 100 µg/animal do péptido MOG35-55 em ACF e receberam duas injeções endovenosas de toxina de *Bordetella pertussis* (300 ng/animal), na altura da imunização e 48 horas depois. Os animais foram pesados diariamente e clinicamente avaliados, utilizando a escala clínica para avaliação de EAE: 0 - normal; 1 - cauda flácida e incontinência urinária; 2 - paraparésia; 3 - paraplegia; 4 - tetraparésia; 5 - morte por EAE. Um surto clínico foi definido como o aumento de 1 ou mais pontos na escala clínica, mantido por 2 ou mais dias, e precedida de uma redução da pontuação por 2 ou mais dias.

Criação e manutenção de linhas celulares T *primers*. Linhas celulares T anti-péptidos Nogo foram desenvolvidas a partir dos gânglios linfáticos de drenagem de ratinhos imunizados com os referidos péptidos emulsificados em ACF. Após a sua dissecação, culturas de linfócitos totais foram estabelecidas (dia 0 do ciclo de proliferação) na presença do péptido cognato (10 µg/ml) em meio de cultura RPMI 1640 (RPMI Medium 1640 com solução tampão HEPES 25mM; GibCO BRL Cat n°22400-089, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com L-glutamina (2mM), piruvato de sódio (1mM), aminoácidos não essenciais (0.1mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (0.1mg/ml), 2 mercaptoetanol (5×10^{-5} M) e 10% de soro de vitelo fetal (SVF), em frascos de cultura de 25 ml. O meio de cultura foi mudado a cada 3-4

dias, e suplementado no dia 3 e dia 7 com IL-2 recombinante 10U/ml; no dia 10 do ciclo, só se procedeu à mudança de meio, sem adição de IL-2. No dia 14 do ciclo (dia 0 do próximo ciclo), as células foram re-estimuladas na presença do péptido cognato; esplenócitos totais irradiados (3000 rad) de um ratinho singénicos foram utilizados como células apresentadoras de antigénio, após lise de eritrócitos com solução tampão ACK (consistindo de 8.29 g de NH_4Cl , 1 g de KHCO_3 , 37.2 mg de NaEDTA dissolvidos em 800 ml H_2O , corrigindo o pH 7.2-7.4 com 1N HCl, e volume final de 1000 ml). O procedimento repetiu-se até se obter uma população relativamente pura de linfócitos T reactivos contra o péptido cognato (em média 2-4 ciclos de estimulação). A concentração celular aproximada foi de 2.5×10^6 células/ml, sendo o volume de cultura modificado de acordo com a proliferação observada. As células empregues nas experiências descritas foram utilizadas no meio do ciclo de proliferação (dia 7), altura em que também se estabeleceram stocks em SVF com 10% DMSO, e armazenamento a -80°C ou em azoto líquido. As linhas celulares anti-PLP139-151 Th1 e Th2 já existiam no nosso laboratório tendo sido o resultado de uma das experiências de prevenção de EAE com vacinas de ADN. Estas linhas foram descongeladas, re-estimuladas e mantidas em cultura para as experiências descritas.

Ensaio de proliferação de células T. No final das experiências *in vivo*, os gânglios linfáticos de drenagem do local de injeção dos péptidos foram dissecados, e culturas de linfócitos estabelecidas em placas de 96-poços num volume de 200 μl e concentração de 0.5×10^6 células/poço, numa incubadora com temperatura ambiente 37°C , 5% CO_2 e humedificação. Para a enriquecimento de culturas em células T a partir de linfócitos ou esplenócitos totais, foram utilizadas ocasionalmente colunas para purificação negativa de células T (R&D Systems, Mouse CD3+ T Cell Enrichment Column, Cat n°MTCC-525, R&D Systems, Minneapolis, MN). Para ensaios de proliferação realizados com linhas celulares, foram utilizadas quantidades variáveis de linfócitos T (tipicamente entre 2×10^4 e 5×10^4 células/poço) conjuntamente com esplenócitos totais irradiados (3000

rad) de animais singênicos (tipicamente 5×10^5 células/poço) como células apresentadoras de antígeno, após remoção de eritrócitos por lise com solução de tampão ACK (consistindo de 8.29 g de NH_4Cl , 1 g de KHCO_3 , 37.2 mg de NaEDTA dissolvidos em 800 ml H_2O , corrigindo o pH 7.2-7.4 com 1N HCl, e volume final de 1000 ml). O meio de cultura consistiu de RPMI 1640 (RPMI Medium 1640 com solução tampão HEPES 25mM; GibCO BRL Cat n°22400-089, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com L-glutamina (2mM), piruvato de sódio (1mM), amino ácidos não essenciais (0.1mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (0.1mg/ml), 2 mercaptoetanol (5×10^{-5} M), sendo adicionados, consoante as experiências, 7-10% de soro de vitelo fetal (SVF), ou 1% de soro fresco de ratinho singênico naïve. A proliferação foi testada contra um conjunto de péptidos, que tipicamente incluem o péptido cognato, péptidos irrelevantes como controlo e concanavalina A como estímulo não antígeno-específico destinado a provar a viabilidade das células. A incorporação de timidina tritiada foi medida num contador de cintilações beta (Wallac, Turku, Finlândia) após administração de $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]TdR (timidina tritiada) (ICN Pharmaceuticals, Irvine, CA) por poço nas 16 horas finais de cultura, e reportada como contagens por minuto (cpm).

Determinação de citocinas por ELISA. A secreção de citocinas foi avaliada para linhas celulares T estabelecidas conforme protocolos da literatura, linfócitos ou esplenócitos totais extraídos de gânglios linfáticos periféricos ou do baço de ratinhos sacrificados, após estimulação com o seu péptido cognato, péptidos controlo e concanavalina A. A presença de interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12p40 e p70), factor de necrose tumoral (TNF) ou interferão gama ($\text{IFN}\gamma$) foi determinada por ensaio de ELISA em *sandwich*, utilizando reagentes de ELISA disponíveis comercialmente e de acordo com os protocolos do fabricante (BD OptEIA Mouse ELISA Set, BD Pharmingen Cat n° 555148 (IL-2), 555232 (IL-4), 555236 (IL-5), 555240 (IL-6) 555252 (IL-10), 555165 (IL-12p40), 555256 (IL-12p70), 558874 (TNF), 555238 ($\text{IFN}\gamma$), 555213 (Assay

diluent), 555214 (TMB substrate reagent set), BD Biosciences, Mountain View, CA). A densidade óptica a 450 nm de cada amostra foi avaliada num leitor Biorad 2550 EIA Reader (Biorad, Hercules, CA), e utilizada para calcular a concentração da citocina medida por comparação com uma curva padrão estabelecida para cada ensaio individual. Nos ensaios de ELISA por captura, os gânglios linfáticos dos animais experimentais foram dissecados e culturas linfocitárias estabelecidas em meio RPMI enriquecido, numa incubadora a 37°C, 5%CO₂ e humidificação (conforme descrito no item sobre ensaios de proliferação de células T), em placas de 96-poços que haviam sido previamente incubadas, sob condições de esterilidade, com um anticorpo primário de captura anti-citocina (10 µl/ml em PBS, incubação durante a noite a 4°C). Antes da colocação das células, as placas foram lavadas duas vezes com PBS estéril com 0.1% de Tween 20 (polietileno sorbitano monolaurato, Sigma Cat nº P-1379, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), bloqueadas com PBS estéril e 20% de SVF a 37°C durante 1 hora, lavadas novamente duas vezes com PBS estéril com 0.1% Tween 20, e finalmente duas vezes com PBS estéril. Após 6 dias de proliferação na presença do seu péptido cognato, péptido controlo ou concanavalina A, as placas foram lavadas com água duplamente destilada para remoção das células e detritos celulares, e o protocolo para realização de ELISA normal prosseguido conforme as instruções do fabricante.

Obtenção de soro para detecção de anticorpos anti-mielina. O soro foi preparado a partir de sangue periférico dos animais experimentais. Obteve-se sangue através dos métodos de punção retro-orbitária, ou de flebotomia da veia dorsal da cauda, segundo protocolos revistos e aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da Universidade de Stanford (Palo Alto, CA). O sangue assim obtido foi arrefecido durante 30 minutos em gelo, seguido de ultracentrifugação durante 30 minutos a 3200 rpm numa centrífuga de bancada. Removeu-se o soro por pipetagem cuidadosa, sendo este, depois, armazenado em alíquotas individuais congeladas a -80° Celsius.

Quantificação de anticorpos séricos específicos para péptidos de mielina por ELISA. Em amostras de soro de ratinhos induzidos com EAE, mediu-se a existência de anticorpos específicos dos isotipos IgG total, IgG2a e IgG1 por método ELISA. Resumidamente, microplacas de 96-poços (Immunolon, Dynex, Chantilly, VA) foram incubadas com péptidos diluídos a uma concentração de 0.010 mg/ml em solução tampão NaHCO₃ (0.1M a pH 8.0) durante a noite a 4°C (100 µl/poço). As microplacas foram de seguida lavadas com solução de lavagem (PBS com 0.05% Tween20), e bloqueadas durante a noite com leite seco sem gordura dissolvido a 5% em PBS. Após lavagem, as amostras foram diluídas em solução diluente (BD Pharmingen Cat n°555213 BD Biosciences, Mountain View, CA) e incubadas com as placas durante 2 horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem, a detecção da ligação de anticorpos foi feita por junção de anticorpo conjugado com fosfatase alcalina anti-IgG, anti-IgG2a e anti-IgG1 (cabra-anti-ratinho, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), a uma diluição de 1:1000 em solução diluente, o substrato enzimático associado e a densidade óptica lida a 405 nm num leitor de microplacas.

Ensaio ELISPOT. Os baços de ratinhos SJL/J imunizados foram retirados após sacrifício dos animais experimentais, e culturas de esplenócitos totais estabelecidas. Para remoção de eritrócitos, procedeu-se à sua lise através de tratamento com a solução de tampão ACK (consistindo de 8.29 g de NH₄Cl, 1 g de KHCO₃, 37.2 mg de NaEDTA dissolvidos em 800 ml H₂O, corrigindo o pH 7.2-7.4 com 1N HCl, e volume final de 1000 ml), seguida de duas lavagens em meio RPMI 1640 (RPMI Medium 1640 com solução tampão HEPES 25mM; GibCO BRL Cat n°22400-089, Invitrogen, Carlsbad, CA). Os esplenócitos foram cultivados a 1x10⁶ células/poço em placas de ELISPOT previamente cobertas com anticorpo primário anti-IL-2 (BD Biosciences Mouse IL-2 ELISPOT Set, Cat n°551076, BD Biosciences, Mountain View, CA) em condições estéreis. O meio de cultura utilizado consistiu de RPMI 1640 (RPMI Medium 1640 com solução tampão HEPES

25mM; GibCO BRL Cat n°22400-089, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com L-glutamina (2mM), piruvato de sódio (1mM), aminoácidos não essenciais (0.1mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (0.1mg/ml), 2 mercaptoetanol (5×10^{-5} M) e 10% de soro de vitelo fetal (SVF). O ensaio foi parado ao fim de 24 horas de estimulação, e a presença de IL-2 detectada através de anticorpo secundário e substrato cromogénico precipitável, conforme o protocolo do fabricante. A leitura e quantificação do número de clones identificável por poço foi feita num aparelho ELISPOT Series 3C Analyzer (Figura 1) utilizando o programa ImmunoSpot, tendo sido realizada para fins destas experiências pela empresa Cellular Technologies Ltd CTL (www.immunospot.com).

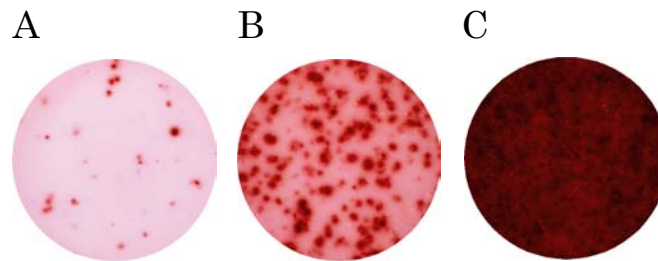


Figura 1. Exemplos de imagens de poços de ELISPOT representativos das três condições principais de reacção. Detecção de clones linfocitários T através de reacção ELISPOT para a secreção de IL-2; a detecção e contagem dos pontos correspondentes a cada clone é feita automaticamente por programa de análise de imagem, conforme descrito no texto. A – não reactivo; B – positivo, detecção de clones linfocitários T anti-MBP85-99 em ratinho SJL/J imunizado com este péptido; C – positivo, estimulação mitogénica com concanavalina A, número de clones incontável pelo programa.

Citometria de fluxo. Para estudos em linhas celulares anti-Nogo, linhas celulares T foram estabelecidas a partir de ratinhos SJL/J imunizados com péptidos Nogo conforme protocolos estabelecidos e mantidas *primers* com estimulação periódica com o seu péptido cognato. Nos estudos ex-vivo, linfócitos totais foram isolados dos gânglios linfáticos de drenagem após imunização subcutânea com péptidos Nogo ou PLP139-151 emulsificado em ACF. Resumidamente, 1×10^6 células para cada condição foram ressuspensas em 200 µl de solução tampão de lavagem (PBS com 1% SVF) e adicionado anticorpo anti-FcγRII e RIII para bloquear a ligação não-

específica dos anticorpos conjugados durante 5 minutos a 4°C (anticorpo anti CD16/CD32 clone 2.4G2, Pharmingen Cat nº553142, BD Biosciences, Mountain View, CA). As células foram depois incubadas com anticorpos secundários conjugados durante 15 minutos a 4°C, lavadas duas vezes com tampão de lavagem e ressuspensas em tampão de lavagem com iodeto de propídio adicionado para avaliação da viabilidade celular, de acordo com as instruções do fabricante (Pharmingen Cat nº556463, BD Biosciences, Mountain View, CA). Os seguintes anticorpos conjugados foram utilizados: PE and FITC anti-ratinho CD3, clone 145-2C11; FITC anti-ratinho CD4, clone GK1.5; FITC anti-ratinho CD8a, clone 53-6.7; FITC anti-ratinho CD25, clone 7D4; PE anti-ratinho CD28, clone 37.51; PE anti-ratinho CTLA-4, clone UC10-4F10-11; PE anti-ratinho CD45RB, clone 16A; PE anti-ratinho CD40L, clone MR1; FITC anti-ratinho CD62L, clone MEL-14; FITC anti-ratinho CD18, clone C71/16; PE anti-ratinho CD44, clone IM7; PE anti-ratinho CD11c, clone HL3; FITC anti-ratinho CD80, clone 16-10A1; FITC anti-ratinho CD86, clone GL1; FITC anti-ratinho CD40, clone HM40-3; FITC anti-ratinho CD69, clone H1.2F3. Todos os anticorpos foram obtidos do catálogo BD Pharmingen (BD Biosciences, Mountain View, CA) (PE – ficoeritrina; FITC – fluoresceína isotiocianato). Finalmente, as células foram recolhidas e analisadas num aparelho de citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) utilizando o programa Cellquest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) e os resultados analisados com o programa FlowJo v6.1.1 (Trustees of Leland Stanford Junior University, Stanford, CA), que também foi utilizado para gerar as representações gráficas dos resultados.

Marcadores utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

CD3: anticorpo contra o complexo CD3 presente em timócitos e linfócitos T maduros. Marcador específico de células T.

CD4: anticorpo contra o antígeno de diferenciação CD4 expresso na maioria dos timócitos e em subpopulações de linfócitos T maduros, e.g. células T com restrição a MHC II incluindo a maioria das células Thelper.

CD8: anticorpo contra o antígeno de diferenciação CD8 expresso numa subpopulação de linfócitos T com restrição a MHC I e com fenótipo Tsupressor/citotóxico.

CD11c (cadeia α integrina): expressa em células dendríticas e linfócitos intraepiteliais intestinais, expressão aumentada após activação.

CD18 (cadeia β 2 integrina): expressão restrita a leucócitos, associada a cadeia α das integrinas LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) e gp150,95 (CD11c/CD18). Dentro

dos esplenócitos, as células NK tem os níveis mais elevados, e os linfócitos T tem uma maior densidade do que a maioria das células. Marcador de activação celular e adesão ao endotélio.

CD25 (cadeia α do receptor da IL-2): expresso em linfócitos T e B activados, não expresso em células em repouso. Marcador de activação celular.

CD28: expresso na maioria dos timócitos, em baixa densidade em quase todos os linfócitos T e B, e ainda menos em células NK. A sua expressão é aumentada após activação de esplenócitos e timócitos. Molécula co-estimuladora que interage com os ligandos CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2).

CD40: glicoproteína expressa por linfócitos B, células foliculares dendríticas, células dendríticas, epitélio tímico e células interdigitantes nas zonas T dos gânglios linfáticos.

CD40L (ligando CD40, CD154): molécula expressa em linfócitos T activados, interage com CD40 para activação de linfócitos B e outras células apresentadoras de antígeno.

CD44: na periferia, o nível de expressão desta molécula aumenta com a activação de linfócitos B, T CD4+ e T CD8+; as células de memória podem ser reconhecidas pela elevada expressão de CD44 (CD44high).

CD45RB: expresso em elevada densidade em linfócitos B periféricos, linfócitos T supressores/citotóxicos, uma subpopulação de linfócitos T_{helper}, e em baixa densidade em células dendríticas e macrófagos. O seu nível de expressão diminui à medida que os linfócitos T assumem fenótipo de células de memória. Os linfócitos T CD4+ com níveis altos e baixos de CD45RB têm funções imunológicas diferentes.

CD62L (ligando CD62, L-selectina, LECAM-1): expresso em leucócitos periféricos, incluindo subpopulações de linfócitos T e B, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. O seu nível de expressão diferencia células T naïve de células com capacidade efectora/memória.

CD69 (very early activation antigen): lectina de tipo C cuja expressão é muito rapidamente elevada após a activação de linfócitos T, B e NK, neutrófilos e macrófagos.

CD80 (B7.1): membro da superfamília das imunoglobulinas, expresso constitutivamente em células dendríticas, monócitos e macrófagos peritoneais. Indutível em linfócitos B após estimulação. Interage com CD28 e CTLA-4.

CD86 (B7.2): expressa num largo espectro de linfócitos, incluindo linfócitos B, T, macrófagos e células dendríticas. A sua expressão é aumentada por diversos estímulos de activação.

CTLA-4 (CD152): molécula co-estimuladora semelhante ao CD28, também interage com CD80 e CD86. Ao contrário da CD28, a sua expressão parece restrita a linfócitos T activados, com um pico máximo as 48-72 horas após activação. Funciona como regulador negativo das respostas imunes.

Análise de estrutura primária. As sequências das proteínas Nogo-66 (humano, rato, ratinho), proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípídica (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG) e glicoproteína oligodendrocitária da mielina (MOG) (todas de ratinho) foram obtidas da base de dados GenBank (números de acesso, respectivamente, CAB99248, CAB71027, AAM77068, NP034907, P60202, NP034888, NP034944), e analisadas usando programas de computador disponíveis livremente em www.expasy.org, para o cálculo dos índices de hidropaticidade, volume, polaridade e factores de reconhecimento.

Figura 2. Tabela de valores de hidropaticidade, polaridade, volume (“bulkiness”) e factores de reconhecimento (segundo KYTE e DOOLITTLE (2), ZIMMERMAN *et al.* (3) e FRAGA (4).

Amino-Ácido	Hidropaticidade	Polaridade	Volume	Factores de reconhecimento
Ala	1.800	0.000	11.500	78.000
Arg	-4.500	52.000	14.280	95.000
Asn	-3.500	3.380	12.820	94.000
Asp	-3.500	49.700	11.680	81.000
Cys	2.500	1.480	13.460	89.000
Gln	-3.500	3.530	14.450	87.000
Glu	-3.500	49.900	13.570	78.000
Gly	-0.400	0.000	3.400	84.000
His	-3.200	51.600	13.690	84.000
Ile	4.500	0.130	21.400	88.000
Leu	3.800	0.130	21.400	85.000
Lys	-3.900	49.500	15.710	87.000
Met	1.900	1.430	16.250	80.000
Phe	2.800	0.350	19.800	81.000
Pro	-1.600	1.580	17.430	91.000
Ser	-0.800	1.670	9.470	107.000
Thr	-0.700	1.660	15.770	93.000
Trp	-0.900	2.100	21.670	104.000
Tyr	-1.300	1.610	18.030	84.000
Val	4.200	0.130	21.570	89.000

A modelação de computador para geração da estrutura primária dos péptidos Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66, Nogo623-640, PLP139-151 e MOG35-55 foi feita utilizando o programa Insight II (Accelrys, San Diego, CA). Para fins de comparação de homologia, utilizámos os programas de alinhamento múltiplo ClustalW, com matriz Blosum, disponíveis em www.ch.embnet.org/software/clustalw.html, e www.ebi.ac.uk/clustalw/. A identificação de locais de ligação a moléculas do complexo MHC classe I e II foi feita com base nos programas ProPred I e II, disponíveis em www.imtech.res.in/raghava/propred. A sequência das proteínas MBP (proteína básica de mielina), PLP (proteína proteolipídica), MAG (glicoproteína associada à mielina), MOG (glicoproteína oligodendrocitária da mielina), OMgp (glicoproteína mielínica oligodendrocítica), Nogo-A (rato e ratinho), foi obtida a partir do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (sequências fornecidas de seguida).

para ligar péptidos e proteínas de mielina, e controlos irrelevantes a lâminas de microscopia cobertas de poli-L-lisina (CEL associates, Pearland, TX). Em cada *array* foram impressos 4-12 réplicas de pontos de cada proteína ou péptido. Para os estudos de reactividade nas experiências de tratamento com vacinas de ADN, foram incluídos 219 péptidos sintéticos e ≤ 13 proteínas de mielina, incluindo 4 proteínas e 85 péptidos derivados da MBP, 3 proteínas e 30 péptidos derivados da PLP, 3 proteínas e 50 péptidos derivados da MOG, 2 péptidos da MOBP, 1 proteína e 16 péptidos da α B-Cristalina, 20 péptidos derivados da CNPase, 1 proteína e 11 péptidos derivados da proteína 2 da mielina periférica (P2), 2 péptidos do receptor de acetilcolina, e 4 péptidos e proteínas não-mielínicos (Figura 3). Para os estudos realizados em experiências de tratamento com vacinação de ADN e ODN, e após imunização com os péptidos Nogo, foram adicionados antígenos aos arrays incluindo os péptidos Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66, Nogo11-30 e Nogo31-52, bem como péptidos sobrepostos derivados da proteína específica de oligodendrócitos (*oligodendrocyte-specific glycoprotein*, OSP) e Golli-MBP.

A metodologia de *antigen arrays* encontra-se descrita em ROBINSON *et al.* (5) e em www.stanford.edu/group/antigenarrays. Brevemente, antes da incubação com as amostras, as lâminas foram bloqueadas com solução tampão (PBS com 3% de SVF e 0.05% Tween 20) a 4°C durante a noite. As amostras de soro dos animais experimentais foram incubadas com as lâminas de array após uma diluição 1:150 em solução tampão durante 1 hora (400 μ l/lâmina), sendo o soro de um único animal experimental utilizado para cada lâmina individual, seguida de lavagem com solução de tampão. A detecção de anticorpos anti-mielina no soro testado foi feita utilizando um anticorpo secundário (cabra-anti-ratinho IgG/M) conjugado com o fluoróforo cianina-3 (anticorpo conjugado anti-Cy-3 IgG/M cabra anti-ratinho ou anti-rato, diluído a 1:3750, incubação durante 45 minutos no escuro, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA), seguida de duas lavagens com solução tampão durante 30 minutos, duas

Figura 3. Lista das proteínas e péptidos contidos nos *arrays* de mielina utilizados nas experiências de vacinação com ADN. Os números (A1-A675) correspondem à sua ordem para disposição no *array*.

A1 MBP 68-86	A76 hMBP 31-49	A308 PLP 110-189
A2 PLP 139-151	A77 hMBP 61-79	A309 PLP 120-139
A4 rMBP 32-47	A78 hMBP 71-89	A310 PLP 150-169
A5 MBP 68-86	A79 hMBP 81-99	A311 PLP 161-180
A7 MBP 87-99	A80 hMBP 91-100	A312 PLP 180-199
A8 rMBP 42-52	A81 hMBP 101-119	A313 PLP 190-209
A9 rMBP 35-52	A82 hMBP 111-129	A314 PLP 130-149
A11 P2 86-99	A83 hMBP 121-139	A315 PLP 200-219
A12 gpSpChHomog	A84 hMBP 131-149	A316 PLP 250-269
A13 P2 65-89	A85 hMBP 141-159	A317 PLP 260-276
A14 P2 26-48	A86 hMBP 151-170	A325.1 PLP protein (glycerol)
A15 MBP 89-101 91Ala	A87 MBP 85-99	A325.2 PLP protein (30% DMF)
A16 bP2 49-64	A88 gpMBP protein	A325.3 PLP protein (20% DMF)
A17 MBP 35-47	A89 bPNS myelin	A326 PLP 139-151
A18 gpMBP	A90 hMBP protein	A327 PLP 103-116
A19 hMBP 84-101	A91 hMBP protein	A328 PLP 140-159
A20 hMBP 87-99	A93 MBP 1-11	A329 PLP 158-166
A21 MBP 87-99	A94 mMBP 1-22	A330 MBP 89-101
A22 MBP 87-99	A95 ACHR 279-291	A331 MBP 13-21
A23 hMBP 83-99	A96 MOG 35-55	A332 MBP 83-99
A24 hMBP 87-99	A97 MOG 35-55	A333 MBP 111-129
A25 hMBP 87-99	A98 HSP 180-188	A334 MBP 131-155
A30 Tetanus and diphtheria toxoids	A99 EYYK	A335 MBP 146-170
A41 gpMBP protein	A112 mP2 1-16	A336 PLP 89-106
A56 Pertussis toxin 133-146	A113 mP2 16-37	A337 PLP 139-154
A57 bP2 protein	A114 mP2 37-56	A338 PLP 178-197
A58 rMBP 1-16 Ac	A115 mP2 79-98	A339 MOG 35-55
A59 rMBP 14-27	A116 mP2 92-106	A340 MOG 11-30
A60 MBP 24-37	A117 mP2 116-131	A341 MOG 21-40
A61 MBP 53-78	A118 P2 61-72	A342 CNPase 343-373
A62 MBP 71-90	A138 PLP 178-191	A343 CNPase 356-388
A63 MBP 87-99	A139 MBP 1-11 Ac	A344 MOBP 21-39
A64 hMBP 87-95	A140 MBP 85-99	A345 MOBP 31-49
A65 hMBP 141-150	A141 MOG 35-55	A347 MOG 1-20
A66 rMBP 10-20	A142 MOG 91-106	A348 hMOG 1-26
A67 MBP 20-37	A144 MOG 35-55	A349 hMOG 14-39
A68 rMBP 30-47	A177 MOG protein	A350 hMOG 27-50
A69 MBP 30-52	A193 MOG protein	A351 hMOG 38-60
A70 MBP 68-86	A205 MOG protein	A352 hMOG 50-74
A71 MBP 89-97	A298 MBP 85-99	A353 hMOG 63-87
A72 MBP 89-100	A300 PLP 1-19	A354 hMOG 76-100
A73 MBP 89-102	A301 PLP 10-29	A355 hMOG 89-113
A74 hMBP 11-29	A302 PLP 110-129	A356 hMOG 101-125
A75 hMBP 21-39	A303 PLP 210-229	A357 hMOG 162-178
	A304 PLP 30-49	A358 hMOG 168-182
	A305 PLP 50-69	A359 hMOG 63-75
	A306 PLP 80-99	A360 hMOG 64-76
	A307 PLP 91-110	A361 hMOG 65-77

A362 hMOG 66-78	A410 rMOG 85-102	A668 abCrys 106-125
A363 hMOG 67-79	A411 rMOG 91-108	A669 abCrys 116-135
A364 hMOG 68-80	A412 rMOG 97-114	A670 abCrys 121-140
A365 hMOG 69-81	A414 rMOG 109-126	A672 abCrys 131-150
A366 hMOG 70-82	A415 rMOG 79-90	A673 abCrys 134-153
A367 hMOG 71-83	A416 rMBP 63-88	A674 abCrys 146-165
A368 hMOG 72-84	A417 rMBP 71-79	A675 abCrys protein
A369 hMOG 73-85	A418 rMBP 71-83	
A370 hMOG 74-86	A419 rMBP 72-84	
A371 hMOG 75-87	A420 gpMBP 63-88	
A372 hMBP 6-14	A421 gpMBP 71-79	
A373 hMBP 7-15	A422 gpMBP 72-85	
A374 hMBP 13-21	A423 mMOG 79-96	
A375 hMBP 14-22	A594 PLP 89-106 biotin	
A376 hMBP 15-23	A597 CNPase 343-373 biotin	
A377 hMBP 20-28	A598 CNPase 356-373 biotin	
A378 hMBP 21-29	A599 CNPase 356-388 biotin	
A379 hMBP 29-37	A600 CNPase 343-355 biotin	
A380 hMBP 79-87	A601 CNPase 374-388 biotin	
A381 hMBP 86-94	A602 CNPase 343-373	
A382 hMBP 90-98	A603 CNPase 356-373	
A383 hMBP 110-118	A604 CNPase 356-388	
A384 hMBP 112-120	A605 CNPase 343-355	
A385 hMBP 136-144	A606 CNPase 374-388	
A386 hMBP 145-153	A608 MBP protein	
A387 hMBP 148-156	A625 PLP 139-151 reverse	
A388 hMBP 149-157	A626 PLP 178-191	
A389 hMBP 150-158	A628 CNPase 343-373 Ac	
A390 hMBP 1-20	A629 PLP 89-106 biotin	
A391 hMBP 80-102	A630 MOG 91-106	
A392 hMBP 108-128	A631 CNPase 343-355	
A393 hMBP 131-153	A632 CNPase 374-388	
A394 hMBP 142-167	A634 CNPase 356-373	
A395 hAChR 60-80	A640 CNPase 343-373 biotin	
A396 rMOG 1-18	A641 MOG 91-106	
A397 rMOG 7-24	A642 CNPase 356-388 biotin	
A398 rMOG 13-30	A643 CNPase 343-355 biotin	
A399 rMOG 19-36	A644 CNPase 374-388 biotin	
A400 rMOG 25-42	A657 abCrys 16-35	
A401 rMOG 31-48	A659 abCrys 26-45	
A402 rMOG 37-54	A660 abCrys 46-65	
A403 rMOG 43-60	A661 abCrys 61-75	
A404 rMOG 49-66	A662 abCrys 61-80	
A405 rMOG 55-72	A663 abCrys 66-85	
A406 rMOG 61-78	A664 abCrys 71-90	
A407 rMOG 67-84	A665 abCrys 76-95	
A408 rMOG 73-90	A666 abCrys 86-105	
A409 rMOG 79-96	A667 abCrys 96-115	

lavagens com PBS simples durante 30 minutos e uma com H₂O duplamente destilada durante 15 segundos, para remoção de fluorescência excessiva. A medição de fluorescência para cada lâmina individual foi feita por *scanning* após estimulação com laser de 532 nm e 635 nm de comprimento de onda num aparelho GenePix (GenePix Personal 4100A Scanner, Axon Instruments, Union City, CA). A avaliação das imagens de arrays individuais, após fusão das duas imagens de scanning com laser, a correcção manual dos arrays de forma a eliminar reactividades anómalas, e a geração de listas finais de reactividade para cada *array* individual foi feita utilizando o programa GenePix Pro v3.0 (Axon Instruments, Union City, CA), sendo depois exportada para folha de cálculo Excel (Microsoft Office 2000, Microsoft, Redmond, WA).

Análise de dados de *arrays* de mielina. O programa GenePix 3.0 (Axon Instruments, Union City, CA) foi utilizado para determinar as intensidades médias dos píxeis para cada ponto individual. As unidades de fluorescência digital média normalizada (DFUs) representam os valores medianos de 4-12 pontos representando cada antigénio em cada array, normalizado para a intensidade mediana de 8 pontos anti-IgG, para que a reactividade normalizada anti-IgG fosse de 25,000 para todos os arrays. A análise estatística de dados para selecção de reactividades com significância estatística foi feita utilizando o programa *Statistical Analysis for Microarrays* (<http://www.stat-class.stanford.edu/SAM/servlet/SAMservelt>). O algoritmo SAM ordena antigénios baseado numa pontuação obtida pela divisão das diferenças entre as reactividades médias para cada grupo por uma função dos seus desvios padrão, e depois estima um valor de falsa descoberta (FDR) para cada antigénio (valor q) através de permutas de medições repetidas entre grupos. Os valores de intensidade dos arrays ajustados por modificação matemática (log₂) (valores inferiores a 10 foram colocados arbitrariamente a 10, e os resultados divididos por 300; pontos antigénicos sem variação entre arrays foram eliminados) foram colocados no programa e os resultados seleccionados com base em critérios que incluem

FDR <0.05, limiares de numerador de 0.7572 (Figuras 26A e 27), 3.2 (Figura 26B e C) e 1.42 (Figura 28). O programa *Cluster* foi utilizado para realizar a análise de agrupamento de forma a agrupar animais e antigénios consoante uma hierarquia baseada numa função de similitude emparelhada. As relações entre animais ou antigénios são representadas por um dendrograma de árvore, em que o tamanho dos ramos reflecte o grau de similitude de reactividade determinado pelo algoritmo de agrupamento. Mapas de reactividade representando as análises de agrupamento, ou mapas de reactividade simples sem agrupamento foram elaborados pelo programa *Treeview*. As imagens de *arrays* individuais foram elaboradas através do programa *Scanalyze*. Os mapas de reactividade e imagens de *arrays* foram anotados, e indicações adicionais colocadas por manipulação gráfica no programa *Adobe Illustrator 9.0*. Todos os programas mencionados anteriormente (*Cluster*, *Treeview* e *Scanalyze*) encontram-se disponíveis em <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

Clonagem de vacinas de ADN. O minigene PLP139-151 foi clonado conforme descrito em RUIZ *et al.*, (7). A sequência completa do gene MOG e MBP foi clonada por RPC a partir de ADNc de cérebro de ratinho (Clontech Marathon-Ready cDNA, Mouse brain Cat n°630400, BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA) utilizando *primers* específicos de sequência. A sequência MOG35-55 foi obtida por subclonagem a partir da sequência MOG completa utilizando *primers* específicos de sequência. A sequência completa do gene IL-4 de ratinho foi clonada por RPC a partir de ADNc de baço de ratinho (Clontech Marathon-Ready cDNA, Mouse Spleen Cat n°639403, BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA) utilizando *primers* específicos de sequência; a constructo IL-4 sem o sequência sinal foi subclonado a partir da sequência completa IL-4, resultando num produto sem os primeiros 20 amino-ácidos da proteína IL-4. No que diz respeito às vacinas de ADN para a proteína Nogo-A em rato, ratinho e humano, duas sequências parciais foram seleccionadas para incluir as regiões codificadoras dos péptidos Nogo623-640 (sequência A) e Nogo-66 (sequência B). *Primers*

específicos de sequência foram desenhados para amplificar as sequências referidas, incluindo na extremidade 5' a sequência de consenso KOZAK e o codão de iniciação de transcrição (GCCGCCATG) e na extremidade 3' o codão de terminação de transcrição e um local de reconhecimento para enzima de restrição (CTCGAGCTA – Xho I; GGATTCCTA – BamH I). Como *template* de amplificação foram usadas colecções de ADNc extraídas de cérebro humano, de rato e ratinho (Clontech Marathon-Ready cDNA, Human brain-whole, Cat n°639300; Mouse brain Cat n°630400; Rat brain Cat n°639412, BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA). Para subclonagem das sequências específicas para os péptidos Nogo623-640 e Nogo-66, foram desenhados novos *primers* específicos de sequência e o processo de clonagem repetido.

Sequência completa Nogo-A (humano).

AACATTTTTCTTTGTTAGGAGATCCTACTTCAGAAAAAAGACCGATGAAAAAATAGAAGAAAAGAGGCCAAATAGTAACAG
AGAAGAATACTAGCACCAAAACATCAAACCTTTTCTTGTCAGCAGCAGGATTCTGAGACAGATTATGTCACAACAGATAATTTAAC
AAAGGTGACT [**GAGGAAGTCGTGGCAAAACAT**] GCCTGAAGGCCTGACTCCAGATTTAGTACAGGAAGCATGTGAAAGTGAATTGAATG
AAGTTACTGGTACAAAAGATTGCTTATGAAACAAAAATGGACTTGGTTCAAACATCAGAAGTTATGCAAGAGTCACCTATCCTGCAGC
ACAGCTTTGCCCATCATTGGAAGAGTCAGAAGCTACTCCTTCACCAGTTTTCGCTGA<CATGTTATGGAAGCACCATTGAATTCTGC
AGTTCTAGTGCTGGTGCTTCCGTGATACAGCCAGCTCATCA [**CCATTAGAAGCTTCTTCAGTT**] AATTATGAAAGCATAAAACATG
AGCCTGAAAACCCCCACCATATGAAGAGGCC [**ATGAGTGTATCACTAAAAAAA**] GTATCAGGAATAAAGGAAGAAATTAAGAGCCT
GAAAATATTAATGCAGCTCTTCAAGAAACAGAAGCTCCTTATATATCTATTGCATGTGATTAAATTAAGAAAACAAAGCTTTCTGCTG
AACCAGCTCCGGATTTCTCTGATTATTCAGAAATGGCAAAAGTTGAACAGCCAGTGCCTGATCATTCTGAGCTAGTTGAAGATTCTC
ACCTGATTCTGAACAGTTGACTTATTTAGTGTATGATCAATACCTGACGTTCCACAAAAACAAGATGAAACTGTGATGCTTGTGAAA
GAAAGTCTCACTGAGACTTCATTTGAGTCAATGATAGAATATGAAATAAGGAAAACTCAGTGCTTTGCCACCTGAGGGAGGAAAGC
CATATTTGGAATCTTTAAGCTCAGTTTAGATAACACAAAAGATACCTGTTACCTGATGAAGTTTCAACATTGAGCAAAAAGGAGAA
AATTCCTTTGCAGATGGAGGAGCTCAGTACTGCAGTTTATTCAAATGATGACTTATTATTCTAAGGAAGCAGAGATAAGAGAACT
GAAACGTTTTCAGATTCATCTCCAATTGAAATTATAGATGAGTTCCTACATTGATCAGTTCTAAACTGATTCTTTCTAAATTAG
CCAGGGAATATACTGACCTAGAAGTATCCACAAAAGTGAATTTGCTAATGCCCGGATGGAGCTGGGTCAATTGCCCTGACAGAAAT
GCCCATGACCTTTCTTTGAAGAACATACAAACCAAGTTGAAGAGAAAATCAGTTTCTCAGATGACTTTCTAAAAATGGGTCTGCT
ACATCAAAGGTGCTCTTATTCGCTCCAGATGTTCTGCTTTGGCCACTCAAGCAGAGATAGAGAGCATAGTTAAACCCAAAGTCTTGT
TGAAAGAACTGAGAAACAACTTCTTCCGATACAGAAAAAGAGGACAGATCACCATCTGCTATATTTTCAGCAGAGCTGATAAAC
TTCAGTTGTTGACCTCTGTACTGGAGAGACATTAAGAAGACTGGAGTGGTGTGTTGGTGCCA [**GCCTATTCCTGCTGCTTTCA**] TTGA
CAGTATTCAGCATTTGTGAGCGT [**AACAGCCTACATTGCCTTTGG**] CCTGCTCTCTGTGACCATCAGCTTT [**AGGATATACAAAGGGTGT
GAT**] CCAAGCTATCCAGAAATCAGATGAAGGCCACCCATTGAGGCATATCTGGAATCTGAAGTTGCTATATCTGAGAGTTGGTTCA
GAAGTACAGTAATTTCTGCTCTTGGTCATGTGAAGTGCACGATAAAGGAAGTCAAGGCGCTCTCTTAGTTGATG [**ATTAGTTGATTC
TCTGAAG**] TTT [**GCAGTGTGATGTGGGTATTT**] ACCTATGTTGGTGCCTTGTAAATGGTCTGACACTACTGATTTTGGCTCTCATT
TCACCTTTCAGTGTTCTGTTATTTATGAACGCATCAGGCGCAGATAGATCATTTCTAGGACTTGCAATAAGAATGTTAAAGATG
CTATGGCTAAAAATCCAAGCAAAAATCCCTGGATTGAAGCGCAAGCTGAATGA

Sequência completa Nogo-A (rato).

GGCAGATTATGTTACAACAGATACCTTATCAAAGGTGACTGAGGCAGCAGTGTCAAACATGCCTGAAGGTCTGACGCCAGATTTAGTT
CAGGAAGCATGTGAAAGTGAAGTGAAGCCACAGGTACAAAGATTGCTTATGAAACAAAAGTGGACTTGGTCCAAACATCAGAAG
CTATAAGAACTACTTTACCCACAGCAGCTTTGGCCATCTTTGAGGAAGCTGAAGCAACT [**GCCGCCATGCGTCACCAGTTT
TGCTGAT**] ATTTGTTATGGAAGCACCATTAAATTTCTCTCCTTCCAAGCGCTGGTGCTTCTGTAGTGCAGCCAGTGATCCCCA [**CTG
GAAGCACCTCCTCCAGTT**] AGTTATGACAGTATAAAGCTTGAGCCTGAAAACCCCCACCATTATGAAGAGCCATGAATGTA [**GCACT
AAAAGCTTTGGGAA**] [**CAAAGGAAGGAATAAAGAGCCTTAGCTCGAG**] GAAAGTTTAAATGCAGCTGTTTCAGGAAACAGAAGCTCCT
TATATATCCATTGCGTGTGATTAAATTAAGAAACAAAGCTCTCCAGTGAAGCAAGTCCAGATTTCTTAATTTACAGAAATAGCAA
AATTCGAGAAGTCGGTGCCGAACACGCTGAGCTAGTGAGGATTTCCTCACCTGAATCTGAACCAGTTGACTTATTTAGTGATGATTC
GATTCCTGAAGTCCACAAACACAAGAGAGGCTGTGATGCTCATGAAGGAGAGTCTCACTGAAGTGTCTGAGACAGTAGCCAGCAC
AAAGAGGAGAGTACTGTGCTCACTCAGGAGCTAGGAAAGCCATATTTAGAGTCTTTTCAGCCCAATTTACATAGTACAAAAGATG
CTGCATCTAATGCATTTCCAACATTGACCAAAAAGGAGAAAATTTCTTTGCAAAATGGAAGAGTTTAACTGCAATTTATTCAAATGA
TGACTTACTTTCTTCAAGGAAGACAAAATAAAGAAAGTGAACATTTTCAGATTATCTCCGATTGAGATAATAGATGAATTTCCC
ACGTTTGTGCTGCTAAAGATGATTCTCTAAATTAGCCAAGGAGTACACTGATCTAGAAGTATCCGACAAAAGTGAATTTGCTAATA
TCCAAGCGGGGAGATTCAATGCCTTGCTTGAAGTGGCTGTGACCTTTCTTTCAAGAAATATATATCTCAAGATGAAGTACATGT
TTCAGATGAATTTCCGAAAATAGGTCCAGTGATCTAAGGCATCCATATCGCTTCAAATGTCTCTGCTTTGGAACCTCAGACAGAA

ATGGGCAGCATAGTTAAATCCAAATCACTTACGAAAGAAGCAGAGAAAAAAGCTTCTTCTGACACAGAGAAAGAGGACAGATCCCTGT
CAGCTGTATTGTCAGCAGAGCTGAGTAAACTTCAGTTGTTGACCTCCTCTACTGGAGAGACATTAAGAAGACTGGAGTGGTGGTGG
TGCCAGCTTATTCCTGCTGCTGCTCTGACAGTGTTCAGCATTGTGAGTGAACGGCTACATTGCCTTG [**GCCGCCATGGCCCTGCT**
CTCGGTGACTATCAGCTTT] AGGATATATAAGGGCGTGATCCAGGCTATCCAGAAATCAGATGAAGGCCACCCATTGAGGGCATATTT
AGAATCTGAAGTTGCTATATCAGAGGAATTGGTTCAGAAATACAGTAATCTGCTCTTGGTCATGTGAACAGCACAAATAAAGAACTG
AGGCGGCTTTCTTAGTTGATGATTTAGTTGATTCCCTGAAGTTTGCA [**GTGTTGATGTGGGTGTTTA**] CTTATGTTGGTGCCTTGT
CAATGGTCTGACACTACTGATTTTAGCTCTGATCTCACTCTTCAGTATTCTGTTATTTATGAACGGCATCAGGTGCAGATAGATCAT
TATCTAGGACTTGCAAACAAGAGTGTAAAGGATGCCATGG [**CCAAAATCCAAGCAAAAATCCCTTAGCTCGAG**] GGATTGAAGCGCAA
AGCAGATTGAAAAAGCCCCAACAGAAAGTTCATCTTTAAAGGGGACACTCACTTGATTACGGGGGTGGGAGGGTCAGGGGTGAGCCCT
TGGTGGCCGTGCGGTTTCAGCTCTTTATTTTATAGCAGTGCCTGTTGAGGAAAAATTACCTGCTCTGAC

Todas as reacções de polimerização em cadeia foram feitas utilizando a enzima Taq polimerase Advantage HF2 (Clontech Cat n° 639123, BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA) e uma estratégia de RCP *touchdown* (94°C-5 minutos/1 ciclo; 94°C-30 segundos, 72°C-30 segundos, 72°C-2 minutos/10 ciclos; 94°C-30 segundos, 70°C-30 segundos, 72°C-2 minutos/10 ciclos, 94°C-30 segundos, 65°C-30 segundos, 72°C-2 minutos/30 ciclos; extensão final 72°C-10 minutos/1 ciclo) numa máquina PE Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). O produto de RCP foi analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio comparando o tamanho do produto com uma escada de ADN (Promega 1Kb DNA ladder, Promega Cat n°G5711, Promega ΦX174 DNA/*Hae* III Markers, Promega Cat n°G1761, Promega, Madison, WI), as bandas observadas com o tamanho correcto cortadas e o ADN extraído utilizando o kit de extracção para gel QIAEX II (QIAGEN Cat n°20051, QIAGEN, Valencia, CA). O produto de amplificação obtido por RCP foi integrado no vector de expressão pTarget (Promega pTarget Mammalian Expression Vector System, Cat n°A1410, Promega, Madison, WI) através de uma reacção de ligação T-A utilizando uma enzima ligase T4 conforme o protocolo do fabricante. O produto de ligação foi integrado em células competentes *Escherichia Coli* JM109 (Promega Cat n°L2001, Promega, Madison, WI) através de choque térmico, conforme o protocolo do fabricante; as células foram expandidas em meio de cultura S.O.C. (Invitrogen Cat n° 15544-034, Invitrogen, Carlsbad, CA) e plaqueadas em meio de cultura IPTG/X-gal/Amp (isopropil-b-galactosidase 0.5 mM, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosidase 40µg/ml, ampicilina 100 µg/ml) (Qbiogene Cat n°3017-134, Qbiogene, Irvine, CA). Foram seleccionadas colónias que demonstraram incorporação do plasmídeo para expansão em 5 ml de meio

de cultura Terrific Broth (Qbiogene Cat n° 3045-042, Qbiogene, Irvine, CA) suplementado com ampicilina 100 µg/ml. Foi isolado ADN de plasmídeo a partir destas culturas primárias utilizando fragmentação das células *E. Coli* por elevadas concentrações de sais caotrópicos, fixação do ADN plasmídeo a membrana de gel de sílica e eluição em água (QIAGEN Spin Miniprep Kits Cat n°27106, QIAGEN, Valencia, CA). A presença do constructo de ADN pretendido foi confirmada através de ensaios de digestão enzimática por enzimas de restrição, seleccionadas conforme o local de restrição incluído nos *primers* (enzima Xho I Promega Cat n°R6165; enzima BamH I Cat n°R6025; Promega, Madison, WI) conforme o protocolo do fabricante, e o produto de digestão analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio em comparação com uma escala de tamanho (Promega 1Kb DNA ladder, Promega Cat n°G5711, Promega ΦX174 DNA/*Hae* III Markers, Promega Cat n°G1761, Promega, Madison, WI). Foram enviados para sequenciação automática os plasmídeos contendo um constructo do tamanho correcto (PAN Facility, Universidade de Stanford, <http://cmgm.stanford.edu>), sendo a sequência confirmada posteriormente por comparação com a sequência publicada no GenBank. Após o sucesso do processo de clonagem para qualquer das sequências referidas anteriormente, foram feitos stocks bacterianos dos clones em 15% glicerol e armazenados a -80°C.

Produção em massa de vacinas de ADN. Após criação dos constructos de ADN necessários no vector de expressão mamífero pTarget, estabeleceram-se stocks bacterianos em glicerol (conforme descrito acima). Para amplificação e produção em massa qualquer das vacinas de ADN, criaram-se culturas primárias a partir dos stocks em placas com meio de cultura IPTG/X-gal/Amp (isopropil-b-galactosidase 0.5 mM, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosidase 40µg/ml, ampicilina 100 µg/ml) (Qbiogene Cat n°3017-134, Qbiogene, Irvine, CA). Colónias individuais foram expandidas em culturas de pequeno volume (5 ml) em meio de cultura LB (Qbiogene Cat n°3002-0419) suplementado com ampicilina 100 µg/ml durante 6-8 horas

para se encontrarem em fase de crescimento exponencial. Ao fim desse tempo, culturas de grande volume (3 litros) suplementado com ampicilina 100 µg/ml foram inoculadas, e o crescimento bacteriano prosseguido durante 12-16 horas. No final deste período, foram extraídas as bactérias do meio de cultura por centrifugação, e o ADN plasmídeo extraído através de lise alcalina e filtração em vácuo, seguido de ligação a resina de troca de iões e eluição por solução tampão de elevada salinidade, e finalmente concentração e dessalinização do ADN plasmídeo por precipitação em isopropanol e centrifugação, seguida lavagem em etanol e ressuspensão em água, PBS ou Tris-EDTA para uma concentração final de 2 mg/ml (QIAGEN EndoFree Plasmid Giga Kit, Cat n°12391, QIAGEN, Valencia, CA). De forma a reduzir a quantidade de endotoxina presente nas vacinas de ADN, foram utilizados materiais e reagentes livres de endotoxina, e o produto filtrado da lise de bactérias incubado com uma solução de remoção de endotoxina (QIAGEN Endotoxin Removal Buffer), segundo o protocolo do fabricante, e que garante uma concentração final de endotoxina de 0.1 EU/µg ADN (1ng endotoxina=1.8 EU). A concentração e pureza do ADN plasmídeo presente na solução final foi confirmada por espectrofotometria num aparelho Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), com a concentração de ADN dada pela absorção a 260 nm (A260), e a pureza pela razão A260/A280. Para as experiências de administração de vacinas de ADN *in vivo*, só foi utilizado ADN com uma pureza superior a 1.8 de razão A260/A280. Pontualmente, foi confirmada a presença do constructo de ADN nos plasmídeos purificados através de ensaio de digestão por enzima de restrição e electroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, em comparação com uma escala de peso molecular, conforme descrito acima (Figura 4).

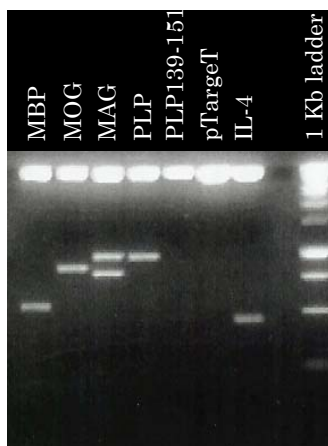


Figura 4. Confirmação da presença do constructo antigénico em vacinas de ADN por ensaio de digestão com enzimas de restrição. Vacinas de ADN contendo os constructos antigénicos correspondendo a diversas proteínas e péptidos de mielina e à citocina IL-4 (MBP, MOG, MAG, PLP, PLP139-151, IL-4), bem como plasmídeo vazio sem constructo (pTargeT) foram submetidas a digestão enzimática com EcoRI e os produtos obtidos analisados por electroforese em gel de agarose (2%). Como se pode observar, para cada vacina surge uma ou mais bandas cuja migração se relaciona com o tamanho do constructo (IL-4>MBP>MAG>MOG>PLP) bem como com o número de locais de restrição (2 para o construto MAG; 1 para todas as outras). O constructo PLP139-151 é demasiado pequeno para ser observado neste gel, donde a ausência de banda; a digestão do vector pTargeT sem constructo não revela, igualmente, qualquer produto.

Protocolo de imunização com vacinas de ADN. Os animais experimentais foram injectados intramuscularmente em ambos os quadrícipites, ou nos tricípites surais com 100 µl de 0.25% bupivacaína-HCl (Sigma Cat nºB5274, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolvida em PBS. Em experiências de prevenção de EAE, os animais foram vacinados com constructos de ADN 2 e 9 dias depois da injeção de bupivacaína, no mesmo local que anteriormente. A quantidade de ADN administrada para experiências de prevenção foi habitualmente de 100 µg/animal, dissolvido em PBS para uma concentração de 1 mg/ml. Nos casos de co-vacinação com dois constructos distintos, cada vacina foi administrada por injeção separada.

Reacção de polimerização em cadeia quantitativa (RPCq). Extraímos ARN total de amostras de encéfalo homogeneizadas por um triturador limpo previamente com água sem RNase (Ambion Cat nº 9906, Ambion, Austin,

TX), etanol a 100% e RNase Zap (Ambion Cat n°9780, Ambion, Austin, TX) na presença de 30 ml de Trizol (Invitrogen Cat n°15596-026, Invitrogen, Carlsbad, CA). As amostras foram congeladas a -80°C até à altura de extracção. Para a extracção de ARN total a partir das amostras homogeneizadas em Trizol foi seguido o protocolo do fabricante, e o ARN total dissolvido em água sem RNase e congelado a -80°C até ser utilizado. Para a sintetização de ADNc de primeira cadeia foi utilizado um procedimento de transcrição reversa utilizando a enzima Omniscript (Omniscript Reverse Transcription Kit, QIAGEN Cat n°205111, QIAGEN, Valencia, CA) de acordo com o protocolo do fabricante, na presença de um *primer* oligo-DT (OPERON Cat n°SP230, OPERON Biotechnologies, Huntsville, AL) e de um inibidor de RNase (RNasin ribonuclease inhibitor, Promega Cat n°N2111, Promega, Madison, WI). Para quantificação de ADNc correspondendo a ARNm dos genes pretendidos nas amostras de encéfalo obtidas fizemos RPC quantitativa utilizando um aparelho LightCycler 1.0 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), a enzima Taq polimerase SYBR Green I (Roche FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I Kit, Cat n° 03 515 869 001, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) e *primers* específicos de sequência (ver lista de *primers*) para genes *housekeeping* e genes de várias citocinas; todos os *primers* foram desenhados de forma a terem temperaturas de derretimento semelhantes (entre $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$), e tamanhos de produto final amplificado idênticos (entre 200-250 pares de bases). Todas as reacções foram feitas na presença de controlo negativo (sem ADNc) para identificação de contaminação, e controlo positivo correspondendo a um plasmídeo contendo a sequência do gene-alvo anteriormente clonado por RCP e *primers* específicos de gene (todos os clones foram anteriormente clonados no nosso laboratório, tendo sido por nós optimizados os pares de *primers* para RPCq). Para estabelecimento de uma curva padrão que possibilite a quantificação do gene-alvo, foram incluídas diluições seriadas de quantidades ($\mu\text{g/ml}$) conhecidas de um standard, correspondendo a um controlo positivo (na maioria dos casos, β -actina). A quantidade de cada gene-alvo é calculada com base na fluorescência emitida pelo produto de

amplificação no final de cada ciclo, e que tem uma relação directa com a quantidade inicial de template existente. Utilizámos um programa de amplificação que inclui uma fase inicial de activação da enzima, seguida de ciclos de amplificação e uma curva de derretimento que permite identificar a presença do produto amplificado, bem como de contaminantes ou de *primer-dimer* (activação: 95°C, 15 minutos, 20°C/s – 1 ciclo; amplificação: 95°C, 15 segundos, 20°C/s; 55°C, 20 segundos, 20°C/s; 72°C, 25 segundos, 20°C/s com aquisição de fluorescência – 60 ciclos; curva de derretimento: 95°C, 0 segundos, 20°C/s; 65°C, 15 segundos, 20°C/s; 95°C, 0 segundos, 0.10°C/s com aquisição contínua de fluorescência; arrefecimento: 40°C, 30 segundos, 20°C/s). A análise dos resultados foi feita no programa LightCycler Software v3.5, utilizando para a quantificação o método do máximo da segunda derivada, e correcção aritmética da linha de base, e para a análise da curva de derretimento análise polinomial com filtro digital.

RPC para repertório da cadeia V β do receptor da célula T. Linhas celulares anti-Nogo1-22, Nogo45-66, anti-PLP139-151 Th1 e anti-PLP139-151 Th2 foram criadas e mantidas *primers* segundo protocolo descrito. A meio de um ciclo de proliferação, as células foram colectadas e mantidas em RNAlater (QIAGEN RNAlater stabilization reagent, QIAGEN Cat n°76104, QIAGEN, Valencia, CA) até à extracção de ARN para protecção. ARN total foi extraído destas linhas celulares utilizando lise por guanidina-isotiociano e purificação por membranas de gel de sílica (QIAGEN RNeasy Mini Kit Cat n°74124, QIAGEN, Valencia, CA), com a adição de DNase para digestão de ADN residual (QIAGEN RNase-free DNase Set Cat n°79254, QIAGEN, Valencia, CA). Para a sintetização de ADNc de primeira cadeia foi utilizado um procedimento de transcrição reversa utilizando a enzima Omniscript (Omniscript Reverse Transcription Kit, QIAGEN Cat n°205111, QIAGEN, Valencia, CA) de acordo com o protocolo do fabricante, na presença de um *primer* oligo-DT (OPERON Cat n°SP230, OPERON Biotechnologies, Hunstville, AL) e de um inibidor de RNase (RNasin ribonuclease inhibitor, Promega Cat n°N2111, Promega, Madison, WI). A presença de cadeias V β do

receptor da célula T foi avaliada por RPC com estratégia de touchdown, conforme descrita acima (temperaturas de ligação 65°C-10 ciclos, 60°C-10 ciclos, e 55°C-30 ciclos) utilizando *primers* específicos de sequência, conforme descritos na literatura (8), e a enzima PCR Master Mix (Promega Cat n°M7502, Promega, Madison, WI). O produto de RCP foi avaliado por electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, na presença de uma escala de tamanho de ADN (Promega 1Kb DNA ladder Cat n°G5711, Promega, Madison, WI).

Primers. Para as experiências de clonagem de vacinas de ADN, detecção de sequências V β do receptor da célula T e RCP quantitativo, *primers* específicos de sequência foram desenhados e sintetizados. O desenho de *primers* para as sequências A e B do gene Nogo-A em humano, rato e ratinho, e de *primers* para RCP quantitativo foi feito utilizando o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), tendo sido introduzida a sequência do gene alvo e seleccionados pares de *primers* com as melhores temperaturas de ligação, conteúdo GC (%) e autocomplementaridade. Para as sequências A e B do gene Nogo, não foi pré-seleccionado o tamanho do produto de amplificação; para os pares de *primers* para RCP quantitativa, foram seleccionados produtos de amplificação entre 200-250 pares de bases, e com conteúdos GC (%) equiparáveis entre si. *Primers* para subclonagem das sequências Nogo633-640 e Nogo-66 nas três espécies (humano, rato e ratinho) foram desenhados com base na sequência conhecida para os referidos péptidos. Os *primers* utilizados para amplificação das sequências V β do receptor da célula T em linhas celulares de ratinhos SJL/J foram baseados nos descritos por BELL (8). Todos os *primers* foram sintetizados localmente num aparelho ABI 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA), e purificados, utilizando processos de química beta-cianoetil fosforamidita (PAN Facility, Universidade de Stanford, <http://cmgm.stanford.edu>). A lista da sequência completa dos *primers* utilizados encontra-se na tabela junta (Figura 5).

Nome	Sequência 5' - 3'
5' mMOG	CGCGGATCCAAGATGGCCTGTTTGTGGAGC
3' mMOG	CTACTCGAGTCAAAAGGGTTCCTTAGCTC
5' mMBP	CGCGCGGCCGCATTATGGCATCACAGAAGAGA
3' mMBP	ACGGGATCCTCAGCGTCTCGCCATGGGAGA
5' mL-4	CGCGGATCCTTGATGGGTCTCAACCCAGCTAGTTGTC
3' mL-4	ACGCTCGAGGTACTACGAGTAATCCATTTGCATGATGC
5' mL-4 signal off	GCCGCCATGCATATCCACGGATGCGACA
3' mL-4 signal off	ACGCTCGAGGTACTACGAGTAATCCATTTGCATGATGC
5' mMAG	CGCGCGGCCGCAAGATGATATCCTCGCCACC
3' mMAG	ACGGGATCCTCAGTGACAATCCCGGGTAGA
5' mPLP	CGCGCGGCCGCGACATGGGCTTGTAGAGTGT
3' mPLP	ACGGGATCCTCAGAACTTGGTGCCTCGGC
5' mMOG35-55	GCAATGGAGGTGGGTGGTA
3' mMOG35-55	TTACTTGCCATTTCCGGTAGAG
5' hNogo-Aseq	GAGGAAGTCGTGGCAAACAT
3' hNogo-Aseq	TGAAAGCAGCAGGAATAGGC
5' hNogo-Bseq	AACAGCCTACATTGCCTTGG
3' hNogo-Bseq	AAATACCCACATCAACACTGC
5' rNogo-Aseq	CCGTCACCAAGTTTGGCTGAT
3' rNogo-Aseq	AGGCTCTTTTATTCCTTCCTTTG
5' rNogo-Bseq	GCCCTGCTCTCGGTGACTATC
3' rNogo-Bseq	AGGGGATTTTGTCTGGATTTTGG
5' hNogo-Nogo623-640	CCATTAGAAGCTTCTTCAGTT
3' hNogo-Nogo623-640	TTTTTTTAGTGATACACTCAT
5' hNogo-Nogo66	AGGATATACAAGGGTGTGAT
3' hNogo-Nogo66	CTTCAGAGAATCAACTAAAT
5' rNogo-Nogo623-640	CTGGAAGCACCTCCTCCAGTT
3' rNogo-Nogo623-640	TTCCCAAAGCTTTTAGTGTC
5' rNogo-Nogo66	CTCTCGGTGACTATCAGCTTT
3' rNogo-Nogo66	TAAACACCCACATCAACAC
mVb1	ATCTAATCCTGGGAAGAGCAAAT
mVb2	GGCGTCTGGTACCACGTGGTCAA
mVb3	GTGAAAGGGCAAGGACAAAAGC
mVb4	GATATGCGAACAGTATCTAGGC
mVb5.1	ACATAATCAAAGGAAAGGGAGAA
mVb6	TCCTGATTGGTCAGGAAGGGCAA
mVb7	TACCTGATCAAAAGAATGGGAGA
mVb8	GTACTGGTATCGGCAGGACAC
mVb9	AGCTTGCAAGAGTTGGAACCA
mVb10	GATTATGTTTAGCTACAATAATA
mVb11	ACAAGGTGACAGGGAAGGGACAA
mVb12	ACCTACAGAACCAAGGACTCAG
mVb13	CAGTTGCCCTCGGATCGATTTTC
mVb14	GCCGAGATCAAGGCTGTGGGCAG
mVb15	AGAACCATCTGTAAGAGTGGAAC
mVb16	CATCAAATAATAGATATGGGGCA
mVb17	GTAGTCCTGAAAAGGGCACACT
mVb18	CATCTGTCAAAGTGGCACTTCA
mVb19	AGACATCTGGTCAAAAGGAAAAG
Cb	GCCAAGCACACGAGGGTAGCC
5' mb actina	TGTCCCTGTATGCCTCTGGT
3' mb actina	CACCGCACGATTTCCTCTC
5' mIFNg	GAGGAAGTGGCAAAGGATG
3' mIFNg	CTGGACCTGTGGGTTGTTG
5' IL10	GGGAAGAGAAACAGGGAGA
3' IL10	TGCTACAAAGGCAGACAAACA
5' mCD3z	GCCCTGTACCTGAGAGCAA
3' mCD3z	TGTGCCGATCTCACTGTAGG

Figura 5. Sequências de *primers* utilizados para reacção de polimerização em cadeia.

Western blots para STAT6 e CD3ζ. Após dissecação dos gânglios linfáticos de drenagem, o tecido foi homogeneizado mecanicamente em 1 ml de uma solução de tampão composta de 0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.001

M EDTA, 1µg/ml aprotinina e 1.6 µM Pefabloc SC (4-(2-Aminoetil)-benzenesulfonil, hidrocloreto fluorado, Roche Cat nº11429868001 (1429868), Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Metade do lisado obtido foi utilizado num ensaio de proteína BCA (Pierce Cat nº23250, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) para quantificação da concentração proteica total. Aos restantes 0.5 ml foram adicionados 0.25 ml de solução de tampão de carregamento 3xSDS contendo uma concentração final de 0.04 M DTT (New England Biolabs Cat nºB7709S, New England Biolabs, Beverly, MA). Os produtos foram analisados por electroforese num gel SDS-PAGE com um gradiente linear de 4%-15% (Bio-Rad Cat nº 161-1122EDU, Bio-Rad, Hercules, CA), por comparação com um marcador de peso molecular pré-marcado (Bio-Rad Cat nº161-0305EDU, Bio-Rad, Hercules, CA). Após electroforese, realizou-se um *blot* entre o gel e uma membrana PVDF (Hybond-P Cat nºRPN303F, Amersham Life Sciences, Piscataway, NJ) numa voltagem constante de 100V em solução tampão de transferência contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% (v/v) metanol. As membranas foram bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente com TBS (soro fisiológico tamponado com Tris), 0.1 % Tween 20 e 20% de leite liofilizado sem gordura. Após lavagem da membrana com TBS e 0.1 Tween 20, as membranas foram hibridizadas durante a noite a 4°C com o anticorpo anti-fosfo STAT6 (New England Biolabs) diluído a 1:1000 em TBS, 0.1% Tween 20 e 5% BSA. As membranas foram então processadas de acordo com o protocolo do sistema ECL Plus (Amersham Cat nºRPN2132, Amersham Life Sciences, Piscataway, NJ) para visualização de bandas por quimioluminescência. As membranas foram limpas por incubação com 100 mM β-mercaptoetanol, 2% (w/v) SDS e 62.5 mM Tris-HCl (pH 7.4) durante 30 minutos a 60°C, e reutilizadas para detecção de CD3ζ com um anticorpo específico contra esta proteína (Pharmingen Cat nº554241, clone 1ζ3A1, BD Biosciences, Mountain View, CA), como controlo para verificar a quantidade de proteína em cada grupo.

Transcrição de *primers*. Os constructos de ADN (PLP139-151, IL-4) utilizados para vacinação foram testados para a produção de uma proteína de tamanho molecular correcto num ensaio de transcrição de *primers*. Aproximadamente 1 µg de ADN plasmídeo foi incubado durante 2 horas a 30°C num volume de 50 µl contendo 25 µl de TNT lisado de reticulócitos de coelho, 2 µl de solução de tampão TNT, 1 µl de TNT ARN polimerase, 1 µl de uma mistura de amino ácidos exceptuando metionina a 1mM (Promega TNT Quick Coupled Transcription/Translation System, Cat n°L1170, Promega, Madison, WI), 4 µl de [³⁵S]-metionina a 10 mCi/ml (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) e 1 µl do inibidor de ribonucleases RNasin a 40 U/µl (RNasin ribonuclease inhibitor, Promega Cat n°N2111, Promega, Madison, WI). Um volume de 3 µl do produto desta reacção foi misturada com solução tampão de amostra SDS (New England Biolabs, Beverly, MA) e analisada num gel SDS-poliacrilamida a 18%. Após secagem, o gel foi exposto a uma película de autorradiografia e esta revelada.

Bibliografia.

1. Zheng, B., C. Ho, S. Li, H. Keirstead, O. Steward, and M. Tessier-Lavigne. 2003. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38:213-224.
2. Kyte, J., and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132.
3. Zimmerman, J.M., N. Eliezer, and R. Simha. 1968. The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods. *J Theor Biol* 21:170-201.
4. Fraga, S. 1982. Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Canadian Journal of Chemistry* 60:2606-2610.
5. Robinson, W.H., C. DiGennaro, W. Hueber, B.B. Haab, M. Kamachi, E.J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M.C. Genovese, H.E. de Vegvar, K. Skriver, D.L. Hirschberg, R.I. Morris, S. Muller, G.J. Pruijn, W.J. van Venrooij, J.S. Smolen, P.O. Brown, L. Steinman, and P.J. Utz. 2002. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8:295-301.
6. Robinson, W.H., P. Fontoura, B.J. Lee, H.E. de Vegvar, J. Tom, R. Pedotti, C.D. DiGennaro, D.J. Mitchell, D. Fong, P.P. Ho, P.J. Ruiz, E. Maverakis, D.B. Stevens, C.C. Bernard, R. Martin, V.K. Kuchroo, J.M. van Noort, C.P. Genain, S. Amor, T. Olsson, P.J. Utz, H. Garren, and L. Steinman. 2003. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nat Biotechnol* 21:1033-1039.
7. Ruiz, P.J., H. Garren, I.U. Ruiz, D.L. Hirschberg, L.V. Nguyen, M.V. Karpuz, M.T. Cooper, D.J. Mitchell, C.G. Fathman, and L. Steinman. 1999. Suppressive immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: modulation of T cell costimulation. *J Immunol* 162:3336-3341.
8. Bell, R.B., J.W. Lindsey, R.A. Sobel, S. Hodgkinson, and L. Steinman. 1993. Diverse T cell receptor V beta gene usage in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 150:4085-4092.

TERCEIRA PARTE

CAPÍTULO VII

Discussão dos Resultados Experimentais.

1. Vacinação com ADN codificador de proteínas de mielina na prevenção e tratamento da Encefalomyelite Autoimune Experimental. Discussão dos resultados, revisão da literatura e proposta de mecanismos de acção.

Os resultados por nós obtidos, e já descritos, respeitantes à prevenção e tratamento de modelos de EAE crónica com e sem surtos, utilizando vacinas de ADN codificadoras de antígenos da mielina, confirmam a eficácia deste tipo de terapêutica antígeno-específica. Resumidamente, julgamos ter apresentado dados que apoiam a eficácia preventiva da vacinação com ADNc codificador do antígeno imunodominante para cada estirpe de ratinho: MOG, e MOG35-55 na prevenção da EAE em ratinhos C57BL/6; PLP, e PLP139-151 na prevenção da EAE em ratinhos SJL/J. Os efeitos terapêuticos destas vacinas foram largamente potenciados pela co-vacinação com ADNc codificador da citocina Th2 IL-4, actuando como forma de terapia génica local. De seguida, empregámos as mesmas vacinas no tratamento da EAE clinicamente estabelecida, ou seja, num paradigma experimental idêntico ao existente nos doentes com EM; neste caso, a utilização da combinação de vacinas de ADN codificadoras da MOG e IL-4 foi eficaz na supressão da doença aguda em ratinhos C57BL/6. Até ao momento em que escrevemos, esta é a única demonstração experimental da eficácia terapêutica das vacinas de ADN antígeno-específicas neste tipo de modelo.

Partindo do pressuposto de que a diversificação de epítomos, ao longo da evolução da resposta autoimune na EAE, levaria à ineficácia eventual de qualquer terapia demasiado focalizada num único autoantígeno, desenvolvemos uma combinação de múltiplas vacinas de ADN, codificadoras das principais proteínas de mielina relevantes para a patogénese da EAE nestas estirpes (MBP, MOG, PLP, MAG), que utilizámos para tratamento crónico da doença. Através desta estratégia, conseguimos uma redução substancial na taxa de surtos, mediada aparentemente por uma redução da diversificação de epítomos na resposta humoral anti-mielina. O estudo da

evolução da resposta humoral foi uma consequência directa do desenvolvimento de novas tecnologias de análise paralela da reactividade humoral, como os *arrays* de mielina (desenvolvidos por William ROBINSON) descritos no capítulo IV. O uso desta tecnologia permitiu-nos, também, pela primeira vez, ilustrar claramente o fenómeno da diversificação de epítomos para a resposta linfocitária B – até esse momento praticamente apenas estudado para a resposta T. Por último, abordámos os problemas associados à administração crónica de ADN bacteriano, relacionados com a presença inevitável de motivos imunoestimuladores. Na tentativa de minorar estes efeitos deletérios, combinámos a vacinação com ADNc com a administração de oligonucleótidos sintéticos imunomoduladores (desenvolvidos por Peggy HO) desenhados de forma a antagonizar os efeitos imunoestimuladores do ADN bacteriano. Esta combinação de duas formas de terapêutica baseada em ADN, antigénio-específica (vacinas de ADN) e não antigénio-específica (ODN imunomoduladores), resultou num aumento da eficácia clínica na supressão da EAE crónica em dois modelos, associada à redução da carga lesional no SNC, ao enviesamento Th2 da resposta celular, e a uma redução ainda maior da diversificação de epítomos da resposta humoral, bem como a uma redução da sua maturidade, reflectida na maior presença de anticorpos IgM.

Comparando estes resultados com os descritos na literatura sobre vacinação com ADN na EAE, podemos observar que os dados existentes, provenientes de vários grupos, utilizando diversos modelos de EAE, aguda e crónica, com e sem surtos, em ratos e ratinhos, com várias combinações de vacinas, apoiam, quase universalmente, a eficácia desta forma de terapia (tabela 1). Os esquemas de vacinação empregues podem ser, globalmente, divididos em dois grandes grupos, conforme são dirigidos ao complexo trimolecular – vacinas codificadoras de antigénios presumivelmente importantes no processo autoimune, como é o caso do nosso trabalho, ou codificadoras de moléculas do TCR -, ou conforme têm como alvo elementos genéricos da resposta imune, por exemplo mediadores solúveis tais como citocinas ou quimiocinas, ou utilizando os efeitos imunomoduladores

intrínsecos ao próprio ADN. Como podemos facilmente observar, existe, apenas, uma minoria de ensaios experimentais em que as vacinas de ADN foram empregues como terapia da doença estabelecida; para além das nossas próprias experiências, somente em um caso (1) foi testada uma vacina anti-IP-10 no tratamento da EAE crónica. Esta é, já, uma volumosa colecção de experiências realizadas, cujos resultados nos permitem, provisoriamente, abordar a questão do mecanismo de acção desta forma de terapia. Iremos de seguida fazê-lo sistematicamente dividindo, para isso, os ensaios experimentais consoante os dois grandes grupos acima referidos.

A vacinação com ADN como terapêutica não antígeno-específica na EAE tem tido como alvos predominantes, as moléculas associadas à resposta inflamatória, como as citocinas e quimiocinas. A primeira demonstração da sua eficácia, neste respeito, foi feita por YOUSSEF *et al.*, utilizando constructos de ADN relativos às quimiocinas C-C MIP-1 α (*macrophage-inflammatory protein 1 α*), MCP-1 (*monocyte-chemotactic protein-1*), MIP-1 β e RANTES. Estes autores reportaram que a vacinação anti-MIP-1 α e MCP-1 teve grande eficácia na prevenção da EAE em ratos Lewis, enquanto que a vacina anti-MIP-1 β agravou a doença, e a anti-RANTES não teve efeito biológico (2). O efeito terapêutico destas vacinas foi atribuído à geração de anticorpos bloqueadores contra as quimiocinas codificadas na vacina, detectados por ELISA, num ensaio quimiotático *in vitro*, e capazes de transferir protecção para animais não-vacinados (2, 3). Estes dados foram encarados, pelos autores, como a prova de quebra de tolerância contra antígenos do próprio, levando a um aumento da rede de anticorpos anti-quimiocinas naturalmente existente (2). Empregando este mesmo paradigma de quebra de tolerância contra antígenos do próprio, WILDBAUM *et al.* utilizaram vacinas de ADN codificadoras do TNF, ligando Fas (FasL/CD95L) e da IP-10 (*IFN γ -inducible protein 10*) para a prevenção do modelo de EAE. No primeiro caso, a vacinação anti-TNF resultou numa melhoria clínica e histológica da EAE, com base na indução de anticorpos bloqueadores específicos para esta citocina pró-inflamatória, tal como anteriormente tinha sido descrito para as quimiocinas C-C (4). A

vacina anti-FasL resultou em protecção contra a indução subsequente de EAE, e na geração de anticorpos específicos contra esta molécula, capazes de reconhecerem o ligando nativo (5). Estes anticorpos reduziram, por sua vez, a produção *in vitro* de TNF por parte de linhas celulares anti-MBP68-86, sem afectarem a produção de IFN γ , IL-4 ou IL-10, e foram capazes de transferir protecção adoptiva para animais com EAE, desde que fossem administrados no início da doença (5). Por último, a utilização de uma vacina codificadora da quimiocina IP-10 resultou, tal como as anteriores, na melhoria dos sinais clínicos e histológicos de doença (com uma redução dos infiltrados inflamatórios presentes no SNC substancial, como seria de esperar do bloqueio desta quimiocina), associada à produção de anticorpos anti-IP-10 (1). Para além de terem efeitos anti-migratórios *in vitro*, estes anticorpos demonstraram influência na polarização Th, uma vez que seriam capazes de bloquear o enviesamento Th1, naturalmente provocado pela IP-10, redireccionando, assim, a resposta linfocitária para Th2. Este efeito reflectiu-se na secreção de citocinas, com uma redução do TNF e INF γ e um aumento da IL-4 *in vitro* (1). A utilização desta vacina anti-IP-10 em ratinhos C57BL/6 com EAE crónica foi também estudada por estes autores; quando administrada durante o primeiro surto da doença, a vacina resultou na supressão dos sinais clínicos da doença, concomitantemente com a indução de anticorpos anti-IP-10; não foram fornecidos mais dados respeitantes ao perfil da resposta imune nesta experiência (1). Como acima referimos, esta é a única outra experiência de tratamento com vacinas de ADN na EAE crónica estabelecida, para além das por nós realizadas. Infelizmente, a pobreza de pormenores sobre esta experiência, existentes nesta publicação, ou posteriormente publicados, impedem a sua análise crítica. Seria importante, por exemplo, caracterizar o perfil da resposta linfocitária contra o antígeno indutor da doença, avaliar a eficácia a longo termo desta vacinação, para além da sua reprodutibilidade no tratamento de outros modelos de EAE crónica. Ainda respeitante ao tema da vacinação contra o sistema das quimiocinas, refira-se, ainda, a menção breve, num artigo recente, de que a vacinação contra os receptores das quimiocinas

MCP-1 e IP-10 (CCR2 e CXCR3, respectivamente) teria alguma eficácia na redução dos surtos, apesar de não influenciar a incidência ou gravidade da EAE (6); uma vez mais, no entanto, não existem dados pormenorizados publicados que permitam a crítica judiciosa desta experiência.

Mais recentemente, foi publicado um trabalho sobre vacinação de ADN contra um outro membro da superfamília TNF, a proteína TWEAK (*TNF-related weak inducer of apoptosis*), capaz de induzir a expressão de IL-6, IL-8, metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1) e IP-10, e de mediar a passagem de leucócitos através da barreira hemato-encefálica (BHE) (7). Este estudo foi baseado no mesmo paradigma de quebra de tolerância contra uma molécula de sinalização considerada importante na patogénese da EAE. No entanto, embora tenha sido utilizado um protocolo idêntico ao descrito por YOUSSEF e WILDBAUM, não foi possível detectar a presença de anticorpos anti-TWEAK; mais ainda, a vacinação resultou num agravamento da doença, concomitante com o aumento de linfócitos T no SNC (7). Este último efeito deveu-se, provavelmente, a um aumento da produção da quimiocina CCL2 no SNC e na BHE provocado pela vacinação (7). Na mesma experiência, a vacinação convencional com a proteína TWEAK e o seu receptor teve efeitos protectores, tal como esperado. Como tal, os efeitos paradoxalmente deletérios da vacinação com ADN anti-TWEAK ilustram a complexidade desta tecnologia; é possível que, neste caso, a vacina tenha resultado na produção de TWEAK solúvel, ao invés de ter produzido quebra de tolerância contra esta proteína (7). A vacinação com ADN codificador de citocinas, ou quimiocinas, poderá ter, assim, dois tipos de efeitos: geração de anticorpos bloqueadores, com consequente perda dos efeitos desse mediador; ou produção local do constructo da vacina, resultando no potenciar dos efeitos biológicos do mesmo.

A nossa experiência com a vacina codificadora de IL-4 ilustra este segundo mecanismo de acção. Tal como descrevemos no capítulo IV (pontos 3-5), a administração desta vacina resultou na produção local, nos órgãos linfóides secundários, de quantidades mensuráveis de IL-4 (Cap. IV, figura 8); mais ainda, a geração de constructos sem a sequência-sinal, necessária

para a secreção desta molécula, ou a utilização de modelos *knockout* para a proteína STAT6, indispensável para a sinalização do receptor da IL-4, eliminou os efeitos benéficos da vacinação com este constructo (Cap IV., figuras 10 e 14). Como tal, atribuímos a eficácia terapêutica da vacinação combinada PLP139-151+IL-4, ou MOG+IL-4, na prevenção e tratamento da EAE, respectivamente (Cap. IV, figuras 9, 11-13, 15), a um efeito de terapia génica local da vacina IL-4, em que a produção de IL-4 funcional fosse capaz de influenciar a diferenciação fenotípica dos linfócitos T *naive*. Veremos, adiante, como este mecanismo de acção se conjuga com as acções antigénio-específicas das vacinas de ADN codificadoras de antigénios de mielina. Tentámos, por várias vezes, utilizar vacinas com ADNc de outras citocinas Th2, tais como a IL-10, IL-13 e TGF β , com base no mesmo raciocínio que presidiu à utilização da IL-4, *i.e.* a indução de um enviesamento fenotípico Th2 benéfico. No entanto, não nos foi possível demonstrar qualquer acção benéfica destas vacinas nos vários ensaios experimentais (dados não mostrados); desconhecemos, neste momento, o motivo pelo qual a administração destas vacinas não teve os mesmos efeitos benéficos que a vacina IL-4. É possível que factores ligados à eficácia da transcrição destas vacinas (que, ao contrário da IL-4, não testámos), ou o papel que estas citocinas têm sobre a diferenciação fenotípica linfocitária, estejam subjacentes a este fenómeno.

Esta dualidade de acções potenciais poderia, também, explicar, em parte, os resultados que obtivemos nas experiências de vacinação de longo termo para tratamento da EAE crónica; em mais que uma situação, a administração da vacina codificadora de IL-4 esteve associada a um enviesamento Th1 da resposta imune (Cap. IV, Figuras 21, 22, 31A e 31B). Este fenómeno foi, sobretudo, aparente num ensaio em que a vacina IL-4 foi usada como único tratamento num dos grupos de controlo, e no qual resultou no maior enviesamento Th1 associado à mais elevada taxa de surtos (Cap. IV, Figuras 19B, 21). A explicação para este fenómeno paradoxal poderá estar na geração de anticorpos anti-IL-4 após quebra de tolerância, sobretudo no contexto da administração repetida, e em grandes

doses, desta vacina. Estes anticorpos poderiam exercer um efeito deletério sobre a diferenciação da resposta imune, potenciando o aparecimento de clones linfocitários anti-mielina de fenótipo Th1. Por mais do que uma vez tentámos dosear estes anticorpos por ELISA, com resultados negativos (dados não mostrados); é possível que, utilizando outros métodos, como BOSSÛ fez recentemente para a vacina de ADN anti-IL-18 (8), tais como *dot-blots* ou ensaios de neutralização *in vitro*, fossemos capazes de confirmar a presença destes anticorpos. De qualquer forma, a adição dos oligonucleótidos GpG teve a capacidade de inverter este efeito de enviesamento Th1, quer pelo seu efeito antagonista sobre os motivos imunomoduladores CpG, quer pela sua capacidade selectiva de estimulação proliferativa de clones Th2. Se for confirmada a existência destes anticorpos anti-IL-4, poderão ser concebidas formas de reduzir a sua aparição, por exemplo, com esquemas de vacinação nos quais a vacina IL-4 seja usada com menos frequência, ou em dosagens menores.

Ainda respeitando à utilização de vacinas codificadoras de citocinas, devem ser comentados os resultados obtidos por LOBELL *et al.*, (9) na utilização das vacinas anti-IL-4, IL-10, TNF e GM-CSF. Nas experiências relatadas por estes autores, a co-vacinação com ADNc de IL-4, IL-10 ou TNF teve, como efeito, a eliminação do efeito protector da vacina anti-MBP68-85, enquanto que o ADNc da GM-CSF não teve qualquer influência no efeito da vacina anti-MBP (9). A interpretação destes resultados foi no sentido de que a administração destas vacinas eliminou, parcialmente, o micro-ambiente Th1 necessário, na opinião destes autores, para a eficácia da vacinação protectora com ADN. Ou seja, e embora tal não seja explicitamente afirmado no seu trabalho, as vacinas anti-citocinas actuariam como forma de terapia génica local, de forma idêntica à nossa vacina anti-IL-4. A vacina IL-4 e IL-10 dariam, necessariamente, um estímulo Th2; por outro lado, o TNF tem vindo, cada vez mais, nos últimos tempos, a assumir uma função reguladora da resposta imune, pelo que a sua administração poderia actuar como um inibidor local do desenvolvimento da imunidade protectora pós-vacinal.

Outro tipo de efeitos não antigénio-específicos tem merecido grande atenção na literatura, tal como referimos anteriormente: a capacidade intrínseca do ADN exercer efeitos imunomoduladores, através da presença de pequenas sequências nucleotídicas, como os motivos CpG, que sendo reconhecidos por receptores específicos da família dos TLR, influenciam diversos aspectos da resposta imune. Em relação à EAE, estes efeitos imunomoduladores poderiam ser revelantes essencialmente de duas maneiras: ou influenciando o mecanismo de acção antigénio-específico das vacinas de ADN, ou sendo aproveitados de forma independente, como terapia não antigénio-específica. De outra forma: a presença de motivos CpG no esqueleto do vector plasmídeo utilizado para vacinação, e que contivesse outro ADNc alvo dessa vacinação, poderia modificar a resposta imune contra esse alvo; em alternativa, os efeitos imunomoduladores do ADN poderiam ser aproveitados através do uso de vectores vazios, ou, mesmo, apenas de sequências imunomoduladoras sintetizadas artificialmente, sem que existisse qualquer alvo antigénico para a vacinação. Por exemplo, no campo das doenças alérgicas, os efeitos imunomoduladores Th1 dos motivos CpG tem potencial como terapia adjuvante (10-12) . Nesta última modalidade de imunomoduladores não-específicos, BOCCACCIO *et al.*, reportaram inicialmente que os efeitos protectores da vacinação de ADN anti-MBP em ratos Lewis eram duplicados inteiramente pela administração do vector de vacinação sem constructo MBP, ou por oligonucleótidos sintéticos contendo motivos CpG, e que estes efeitos eram mediados por uma modificação na capacidade de secreção de citocinas (13). Nos animais tratados com ADN, foi detectado um aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF β , mas, também, do IFN γ , cujo papel na EAE tem vindo a expandir-se para incluir, para além das suas funções inflamatórias mais conhecidas, capacidades reguladoras da resposta imune (13). No mesmo trabalho, acima comentado, em que LOBELL *et al.*, utilizaram co-vacinação com ADNc de citocinas, foi proposto por estes autores que a presença de motivos CpG com o seu efeito imunoestimulador Th1 era indispensável à eficácia da vacinação protectora com ADN no mesmo modelo de EAE em ratos Lewis (9). Neste caso, a

utilização de uma vacina na qual o vector tinha sido modificado para excluir a presença de sequências CpG não teve eficácia na prevenção da EAE. No entanto, na mesma altura, TSUNODA *et al.*, obtiveram resultados completamente opostos a estes, na utilização de ADN bacteriano como tratamento dos modelos de TMEV-IDD (*THEILER murine encephalomyelitis vírus – inflammatory demyelinating disease*) e de EAE crónica em ratinhos SJL/J (14). Nas suas experiências, a administração de plasmídeo bacteriano vazio resultou num aumento da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12 e IFN γ , na estimulação *in vitro* da função das células NK, e no agravamento significativo do modelo de desmielinização viral TMEV-IDD, do ponto de vista clínico e histológico. Quando testado no modelo de EAE crónica em ratinhos SJL/J, a administração de vector vazio teve, igualmente, efeitos deletérios, resultando num agravamento clínico e histológico, bem como em sinais de enviesamento Th1 nos linfócitos periféricos (14). Os nossos próprios resultados, relatados neste trabalho e publicados recentemente (15), levam-nos, antes de mais, a concordar com a importância dos efeitos biológicos *in vivo* evidenciados pelo ADN bacteriano. Na sua maioria, as nossas experiências apoiam a crença nos efeitos deletérios dos efeitos CpG presentes nos vectores de vacinação, ou administrados isoladamente. Em várias experiências descritas nesta tese, foram utilizados vectores vazios como grupo de controlo nos ensaios terapêuticos de vacinas anti-mielina. Na sua maioria (Cap. IV, figuras 2- 7, 9, 12, 15, 18, 34, 35), a vacinação com o vector pTarget (pT) resultou num agravamento clínico da EAE, num aumento da taxa de surtos em modelos crónicos, e no enviesamento Th1 da resposta linfocitária. Devem-se assinalar, no entanto, duas excepções a esta norma: numa experiência de tratamento crónico em ratinhos SJL/J, a administração do vector pT levou ao enviesamento Th2 da resposta T, apesar da ausência de sinais de melhoria clínica (Cap. IV, figuras 29-33); noutra experiência, a vacinação perilinfática com pT teve efeitos protectores sobre o aparecimento de EAE e levou, igualmente, a uma modificação Th2 da resposta celular (Cap. IV, figuras 36-37). É possível que a utilização crónica de ADN nas experiências

de tratamento de longo termo, no primeiro caso, ou a modificação da via de administração de ADN, no segundo caso, possam ter tido influência sobre o aparecimento destes resultados. Para além destas experiências, relembramos todo o trabalho realizado com oligonucleótidos sintéticos (Cap. IV, figuras 39-42), no qual ficaram demonstrados os efeitos negativos associados aos motivos CpG, e a sua eliminação por motivos GpG antagonistas (publicado em (15)). Nestas experiências, os motivos CpG evidenciaram a sua capacidade estimuladora da proliferação de clones auto-reactivos, sobre a expressão de MHC e moléculas co-estimuladoras por parte das APC, e sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias (15). A utilização de uma sequência imunomoduladora GpG resultou no anulamento destes efeitos estimuladores dos motivos CpG, bem como numa capacidade específica de estimulação de linhas celulares Th2 e da expressão da molécula de apresentação de antígenos CD1d (15). Referindo-nos, ainda, às experiências com resultados positivos na utilização de pT, parece inteiramente possível que, na sequência inteira dos vectores existam outros motivos imunomoduladores com acções próprias – a administração de vector não é equiparável à de oligonucleótidos purificados. No seu conjunto, como tal, os nossos resultados apoiam o conceito de que, numa doença predominantemente Th1 tal como a EAE (e, presumivelmente, a EM), a administração de motivos CpG imunoestimuladores como terapêutica trará riscos potencialmente importantes, e deve ser evitada; mais ainda, o bloquear das suas acções poderá ser benéfico.

A vacinação de ADN dirigida ao complexo trimolecular foi a primeira via terapêutica tentada para o tratamento da EAE, fazendo 10 anos à data deste trabalho. O artigo inicial, de Ari WAISMAN e Lawrence STEINMAN, foi já comentado por nós anteriormente (Cap. IV, ponto 1). Resumidamente, emulando as experiências de vacinação com péptidos derivados do TCR, ou mesmo com clones linfocitários patogénicos, neste trabalho foi utilizada uma vacina de ADN codificando a sequência V β 8.2 do receptor da célula T associado à reacção encefalitogénica anti-AcMBP1-11 (revisto no Cap. II), administrada num esquema preventivo em ratinhos PL/J (H-2^u); a vacinação

resultou numa redução da incidência e gravidade da EAE, bem como numa modificação Th2 do fenótipo da resposta celular (16). Mais tarde, KUMAR *et al.*, utilizando outra estirpe de ratinho com o mesmo *background* H-2 (B10.PL), confirmaram a eficácia da vacinação anti-V β 8.2 na prevenção da EAE, e propuseram outro mecanismo complementar de acção. Estes autores tinham já identificado que a geração espontânea de células T reguladoras CD4⁺ anti-V β 8.2 (péptido FR3, sequência de aminoácidos 76-101 do I-A^u) era responsável pela recuperação após o primeiro ataque neste modelo de EAE (17, 18). Utilizando vacinas de ADN com a sequência V β 8.2 nativa, ou com uma sequência alterada na qual não existia a região FR3, foi proposto que a vacinação com ADNc da V β 8.2 levaria à geração e expansão de uma população de células reguladoras CD4⁺ anti-FR3, que, por sua vez, influenciariam o fenótipo Th das células T anti-MBP (19). Posteriormente a estes trabalhos, Yoh MATSUMOTO publicou um ensaio experimental idêntico no modelo de EAE em ratos Lewis; neste caso, após definição do repertório V β através de espectrotipagem, o autor utilizou uma combinação de vacinas anti-V β 8.2 e V β 10 com resultados positivos, embora sem ter confirmado o efeito enviesador Th2 (20). O mesmo grupo, utilizando uma estratégia semelhante no modelo de EAE crónica em ratos DA, confirmou uma capacidade preventiva parcial da vacinação de ADN anti-V β 10 e V β 15, embora sem providenciar mais dados sobre a resposta imunológica (21). No entanto, a mesma estratégia de vacinação, utilizando administração por *gene gun* da vacina de ADN anti-V β 8.2 e V β 10 no rato Lewis não obteve os mesmos efeitos protectores na dosagem recomendada para esta via de administração (5 μ g), e apenas efeito parcial com uma dosagem 9 vezes superior a esta (45 μ g) (20). Este é o único ensaio que conhecemos de vacinação com ADN na EAE utilizando *gene gun*, pelo que não é possível comentar sobre as desvantagens da mesma; a única experiência comparável é a de KWON *et al.*, que, recentemente, reportaram um ensaio de prevenção da EAE com vacinação intradérmica de ADNc do V β 8.2 em ratinhos B10.PL. Apesar de não ter a mesma reprodutibilidade que a vacinação por *gene gun*, a vacinação intradérmica destina-se a estimular o mesmo tipo de resposta

imune. Neste ensaio, a vacinação teve um efeito protector parcial, resultando uma supressão parcial da proliferação linfocitária à periferia, mas sem qualquer efeito sobre o fenótipo Th, ou sobre a produção de anticorpos (22). No seu conjunto, os resultados destes trabalhos confirmam a eficácia preventiva da vacinação anti-TCR na prevenção da EAE; não existem dados sobre o tratamento da doença estabelecida, nem sobre a eficácia em modelos de EAE nos quais não exista uma restrição tão marcada de repertório de TCR, como seja a EAE crónica com surtos no ratinho SJL/J. Esta ausência de restrição, como tivemos anteriormente oportunidade de comentar, poderá ser uma limitação importante desta forma de terapia dirigida ao complexo trimolecular.

Em comparação com as estratégias de prevenção acima comentadas, a vacinação com ADNc codificador de proteínas de mielina tem sido alvo de vários estudos ao longo da última década. A utilização de vacinas de ADN, como forma de administração de antígenos do próprio, implicados em doenças autoimunes, é uma evolução natural das estratégias terapêuticas antígeno-específicas baseadas na administração desses mesmos antígenos sob a forma de proteínas ou péptidos. Este tipo de imunização terapêutica tem sido empregue na prevenção de vários modelos experimentais de autoimunidade, sobretudo na diabetes em ratinhos NOD, artrite adjuvante e EAE, variando os antígenos consoante o órgão-alvo (revisto no Cap. III). Para a EAE, as primeiras tentativas de vacinação preventiva foram realizadas por LOBELL *et al.*, (23). No modelo de EAE no rato Lewis (no qual o epítipo imunodominante é a MBP68-85), estes autores utilizaram um constructo de ADNc codificando 7 sequências MBP68-85 em *tandem*, com e sem fusão a uma sequência (Z) análoga ao domínio B de ligação às imunoglobulinas da proteína A estafilocócica; esta junção à sequência Z destinou-se a testar se a alteração de via de apresentação do antígeno codificado (neste caso pela via linfocitária B) teria impacto na tolerogenicidade da vacinação. De facto, a vacinação com o constructo pZZ/MBP68-86 foi o único com capacidade de prevenção dos sinais clínicos e histológicos de EAE neste modelo, associada a uma redução da secreção de

IFN γ , mas sem modificações na IL-4 ou IL-10, por parte dos linfócitos T anti-MBP, e a uma redução global dos anticorpos anti-MBP (23). Na sequência deste trabalho, os mesmos autores estudaram o efeito da presença de motivos CpG na estrutura do seu vector de vacinação, elaborando vacinas nas quais estas sequências tinham sido retiradas, ou adicionadas, respectivamente. Como acima referimos, nas suas experiências, a presença de motivos imunoestimuladores CpG revelou-se fundamental para garantir a eficácia da vacinação, embora tivessem sempre de estar associados à sequência antigénica (9). Ao contrário do reportado por outros autores, a administração de vector vazio, mesmo com a adição de sequências CpG, não teve qualquer efeito benéfico. Neste trabalho, ao contrário do inicialmente encontrado, a vacinação com ADN não resultou em qualquer modificação do perfil de secreção de citocinas mas, sim, numa supressão parcial da proliferação linfocitária anti-MBP, sugestiva de anergização da resposta T (9). A especificidade antigénica destas vacinas foi, de seguida, testada, através da construção de vacinas contendo ADNc da MBP68-85 de cobaio e de rato (que diferem apenas num único aminoácido – 79Ser>Thr), uma isoforma da MBP de 21.5 kDa (MBP21.5), ou o epítipo dominante secundário nos ratos Lewis MBP81-109. Após vacinação com cada um destes constructos, a capacidade protectora foi testada através da indução de EAE com MBP68-85 de cobaio, rato ou com MBP total de cobaio. Os resultados desta experiência confirmaram a grande especificidade antigénica das vacinas: a vacina anti-MBP68-85 de cobaio apenas conferiu protecção contra a EAE induzida com este péptido ou com a MBP total, mas não com a MBP68-85 de rato ou a MBP89-101, passando-se o mesmo com as outras vacinas testadas (24). Ou seja, a vacinação com ADN leva a uma resposta imune específica de antigénio, e que consegue distinguir, mesmo, diferenças de apenas 1 aminoácido (entre a MBP de cobaio e rato). Tal como no anterior trabalho deste grupo, a vacinação com ADN resultou na supressão da proliferação contra o encefalitogénio indutor, provocada, eventualmente, quer por anergia clonal dos linfócitos auto-reactivos *naive*, quer pelo estabelecimento de imunidade reguladora anti-idiotípica após uma reacção

imune Th1 sub-encefalitogénica, específica contra o epítipo codificado na vacina de ADN (24). Os dados existentes nestes três estudos foram integrados num paradigma de funcionamento, no qual a eficácia da vacinação com ADN estava dependente da expressão elevada no constructo híbrido MBP, do seu reconhecimento por imunoglobulinas e células B, que o efeito era extremamente antigénio-específico e que a existência de motivos imunoestimuladores CpG era essencial (9, 23, 24); a vacinação induziria uma reacção celular Th1 contra o antigénio codificado, que, por sua vez, estimularia o aparecimento de uma resposta reguladora anti-idiotípica com capacidade protectora. Posteriormente a estes estudos iniciais, os mesmos autores alargaram as suas experiências de vacinação a outro modelo de EAE com outro antigénio: ratos DA e ratos Lewis congénicos com a expressão do mesmo antigénio HLA (RT1^{av}), nos quais o epítipo imunodominante é a MOG91-108. Neste sistema, a vacinação mostrou-se, novamente, eficaz, embora em circunstâncias diferentes: a presença da proteína de fusão Z (para ligação às Ig) não só não foi necessária, como a sua presença eliminou o efeito protector da vacinação (25). A presença de motivos CpG continuou a ser determinante para a eficácia da vacinação; no que respeita ao estudo da resposta imune, não foram encontradas diferenças em relação à resposta celular, mas, apenas, um aumento de anticorpos anti-MOG IgG2b nos animais protegidos, sugerindo, uma vez mais, a importância da resposta Th1 (25). As diferenças entre os resultados obtidos nestes dois modelos estariam relacionadas com a imunopatogénese da EAE induzida por MBP ou por MOG: enquanto que a EAE-MBP é mediada, essencialmente, por uma resposta celular Th1, na EAE-MOG a resposta humoral anti-MOG é essencial e deletéria. Presumivelmente, a associação do produto vacinal às Ig, com a consequente ligação ao receptor Fc, poderia influenciar o processamento antigénico do constructo da vacina pelas APC, ou influenciar a produção de lesões desmielinizantes por mecanismos associados à resposta celular (25). Em relação aos mecanismos de acção, este trabalho voltou a reforçar o conceito da imunidade Th1 protectora, apesar de não providenciar mais elementos de apoio para tal; mais recentemente, foi reportado neste

modelo que a vacinação com ADNc da MOG91-108 resultava na estimulação de uma população de células dendríticas plasmacitóides (*i.e.* com expressão elevada de TLR9 e, conseqüentemente, capacidade de resposta aos motivos CpG), e na produção antigénio-específica de interferão beta (IFN β), o mesmo agente terapêutico utilizado na EM (26, 27). Desta forma, outro modo de actuação da vacina de ADN anti-MOG91-108 seria através da produção endógena de um imunomodulador sistémico como o IFN β , presumivelmente pelas células dendríticas plasmacitóides estimuladas pelos motivos CpG presentes na vacina (27).

Antes de descrever, em maior pormenor, o paradigma de funcionamento das vacinas de ADN proveniente das nossas próprias experiências, deve ser mencionado que nem todos os ensaios experimentais com vacinas anti-mielina tiveram resultados positivos, tal como se pode constatar da leitura da tabela 1. De facto, existem pelo menos 4 estudos publicados em que os autores descreveram agravamento da EAE após vacinação preventiva com ADN. No primeiro destes trabalhos, TSUNODA *et al.*, utilizaram plasmídeos contendo a sequência PLP completa, bem como a da PLP139-151 ou PLP178-191, em ratinhos SJL/J; após vacinação com estes constructos, a indução subsequente de EAE com PLP139-151 resultou numa forma de doença mais severa, clínica e histologicamente, que no grupo de controlo vacinado com vector vazio, bem como num aumento da resposta proliferativa contra o antigénio codificado na vacina (28, 29). Este trabalho possui, no entanto, uma deficiência incapacitante, nomeadamente a ausência de grupo de controlo não-vacinado; de facto, e dado o acima exposto sobre a modulação da resposta imune pelo ADN bacteriano, a única conclusão passível de ser retirada deste trabalho é que a vacinação com plasmídeo vazio teve efeito protector quando comparada com a vacina codificadora de PLP. Os mesmos autores publicaram um trabalho, mais tarde, em que referiam os efeitos deletérios do ADN bacteriano na EAE (28). Outro estudo, publicado por BOURQUIN *et al.*, no qual foi utilizado o modelo de EAE crónica induzida em ratinhos SJL/J com PLP139-151 ou MOG, a vacinação preventiva com um constructo codificador da MOG

resultou numa maior susceptibilidade à doença; nestes animais, a vacinação com ADN levou a um aumento da resposta humoral IgG2a anti-MOG, sem afectar a resposta proliferativa T ou a secreção de citocinas (30). Uma vez mais, parece-nos que este trabalho é enfermado pelo seu desenho experimental; de facto, nos dados clínicos reportados, torna-se fácil observar que o protocolo de indução de EAE utilizado resultou numa doença de fraquíssima gravidade nos grupos de controlo, o que inviabiliza comparações com os dados de outras experiências e põe em causa a fiabilidade dos resultados obtidos.

Dois outros trabalhos, provenientes do mesmo grupo, investigaram os efeitos da variação no tempo entre a vacinação e a indução de doença. Inicialmente, estes autores relataram que a vacinação com o ADNc da PLP tinha um efeito preventivo sobre a EAE induzida em ratinhos SJL/J, desde que a vacinação ocorresse mais que 10 semanas antes da indução da doença; para intervalos de tempo menores, o efeito era, paradoxalmente, de agravamento clínico (31), o que foi confirmado no segundo destes trabalhos (32). A prevenção, ou agravamento, estavam correlacionados com a supressão, ou estimulação, da proliferação anti-PLP, e com a produção de IFN γ e IL-2 (31, 32). A existência de um fenómeno semelhante foi, de seguida, investigada no modelo de EAE em ratinhos C57BL/6 após vacinação com ADNc da MOG; neste caso, no entanto, não foi observado qualquer efeito diferencial dependente do tempo mediado entre a vacinação e a indução da doença, e a vacinação foi sempre eficaz, resultando numa supressão da proliferação e na redução da produção de IL-2 e IFN γ , bem como num ligeiro aumento de IL-10 (32). Em relação a estes trabalhos, parecem-nos relevantes alguns comentários gerais, respeitantes à variabilidade intrínseca à vacinação antigénio-específica com ADNc de proteínas de mielina. Em primeiro lugar, é natural, dada a diversidade de modelos experimentais usados, bem como os esquemas de vacinação (dosagem, número de vacinações), e vectores empregues, que possa existir alguma variabilidade nos resultados obtidos por diferentes grupos que trabalham nesta área. Depois, mesmo pormenores simples como a

variabilidade na técnica de injeção (convertendo injeções intramusculares em intradérmicas, ou perilinfáticas, sobretudo em animais muito jovens, ou com paraparésia crónica), ou pormenores referentes à produção das vacinas (quantidade de endotoxina presente, veículo de solubilização da vacina, pH e temperatura de administração), podem ter grande influência na resposta imune. Nas nossas já numerosas experiências de vacinação preventiva ou terapêutica, só encontramos casos de agravamento da doença, ocasionalmente, com a utilização da vacina IL-4, ou com vector vazio (como acima referimos); em caso algum, a administração de vacinas com ADNc de proteínas de mielina teve algum efeito deletério observável, em qualquer dos modelos estudados. Pelo contrário, a reprodutibilidade dos resultados experimentais foi a regra; na maioria, os ensaios experimentais tiveram efeitos positivos, ou, no extremo, não modificaram a evolução natural da doença de forma significativa. Não realizámos experiências de prevenção com diferentes tempos de administração de vacinas, de forma a comparar os nossos resultados com os de SELMAJ *et al.*; como tal, reservamos os nossos comentários até ser possível compreender os mecanismos que medeiam os efeitos paradoxais encontrados por esses autores.

No que respeita a outros modelos experimentais de doença autoimune, tratados com vacinação de ADN, existem escassas referências a agravamento induzido pela vacinação. No modelo talvez mais estudado a seguir à EAE, a diabetes em ratinhos NOD, a vacinação antigénio-específica com ADNc da região imunodominante da cadeia B da insulina, da HSP70 ou da GAD65 tem tido efeitos protectores; em raras situações, foram reportados agravamentos com vacinas codificadoras da insulina, ou da GAD65 (33-35). Ou seja, embora os resultados dos ensaios experimentais apoiem, na sua maioria, a utilização desta nova forma de terapia antigénio-específica, podem surgir efeitos paradoxais inesperados uma vez que são incertas, ainda, as regras que regem a resposta imune à vacinação com ADN, e a nossa compreensão dos mecanismos de acção desta terapêutica é limitada. Em nossa opinião, e em virtude do acima dito, a comparação directa de resultados entre os diferentes estudos pode ser deveras melindrosa, até por

que a qualidade dos dados apresentados nos trabalhos nem sempre permite ter uma opinião positiva sobre o desenho experimental dos mesmos. Apesar disso, encaramos estes estudos como ilustrações de uma verdade elementar respeitante a qualquer terapêutica antigénio-específica, a de que as regras respeitantes à regulação imune são mal conhecidas, e que é difícil prever os resultados de uma terapia com múltiplos efeitos potenciais sobre o Sistema Imune, quer num modelo experimental artificialmente induzido, e, sobretudo, numa situação clínica complexa como a EM.

Tivemos, recentemente, a oportunidade de comentar os nossos trabalhos publicados sobre este tema, e de propor um modelo de funcionamento para a vacinação com ADN, que, de seguida, explicaremos em maior detalhe (36). As experiências iniciais do nosso grupo com vacinas de ADN codificadoras de antígenos de mielina utilizaram o minigene PLP139-151 no modelo de EAE crónica com surtos em ratinhos SJL/J induzido pela imunização com o péptido PLP139-151 (tal como elaborámos em detalhe no Cap. IV, ponto 1). Resumidamente, a utilização desta vacina como estratégia preventiva resultou numa diminuição da gravidade da doença, associada à supressão da proliferação contra o antígeno indutor e a uma redução na produção de citocinas Th1 (37). Foi demonstrado, também, que células apresentadoras de antígeno incubadas com esta vacina tinham uma alteração na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (37). A nossa interpretação destes dados foi a de que a vacinação com ADNc do próprio levou a um estado de anergia funcional dos linfócitos T, provocado pela falta de co-estimulação adequada, um fenómeno a que chamámos *vacinação supressora* (Figura 1A). Num outro modelo de EAE, em ratinhos C57BL/6 induzidos com MOG35-55, demonstrámos, igualmente, a eficácia preventiva da vacinação antigénio-específica com constructos MOG, embora, neste caso, o mecanismo de acção fosse associado, também, à geração de uma resposta Th2. De seguida, na tentativa de melhorar a eficácia desta forma de vacinação, utilizámos constructos codificadores de citocinas Th2, como a IL-4, que actuam como forma de terapia génica local; a vacina IL-4 é transcrita em IL-4 funcional, que é,

depois, segregada e actua sobre o seu receptor, presente no linfócito T, activando a molécula de sinalização STAT6 (38) (Figura 1B). A vacinação combinada com os constructos da PLP e IL-4 resultou num aumento significativo da eficácia preventiva, relacionado com a geração de linhas celulares T anti-PLP de fenótipo Th2, e capazes de transferir protecção, de forma adoptiva, para outros animais (38). Ou seja, neste caso, ao inverso do obtido anteriormente, a vacinação com ADN não induziu anergia funcional, mas, sim, um enviesamento Th2 benéfico, o que denominámos *vacinação tolerizadora*. Os dois constructos empregues têm destinos diversos: enquanto que a vacina PLP é transcrita e apresentada no contexto do MHC classe II, providenciando o estímulo antigénio-específico, a vacina IL-4 é transcrita em IL-4 funcional, que após ser segregada, actua no linfócito *naive* em diferenciação, induzindo um fenótipo Th2 (Figura 1B). No modelo de EAE-MOG, a eficácia da prevenção é, de igual forma, potenciada pela junção da vacina IL-4. Confirmámos, por fim, nestes estudos iniciais, que a utilização de vacinas codificadoras de toda a proteína de mielina era mais eficaz e de forma mais reprodutível que vacinas com apenas o minigene codificador do epítipo imunodominante. Até este momento, os nossos resultados são comparáveis com os obtidos por outros grupos, nomeadamente pelo de Anna LOBELL, embora sejam obtidos num modelo diferente de EAE. Saliente-se, no entanto, que os constructos empregues continham uma sequência derivada da proteína estafilocócica, destinada a orientar a resposta à vacinação para as imunoglobulinas e células possuidoras de receptores Fc. Mais ainda, ao contrário do postulado por esses autores, no nosso modelo a eficácia da vacinação está nitidamente associada à indução de uma população linfocitária Th2 reactiva contra o antigénio codificado, com capacidade supressora; para LOBELL, o microambiente Th1 gerado pelas suas vacinas induz uma resposta sub-encefalitogénica que gera, por sua vez, uma resposta reguladora que tem, ela sim, efeitos benéficos sobre a indução subsequente de EAE.

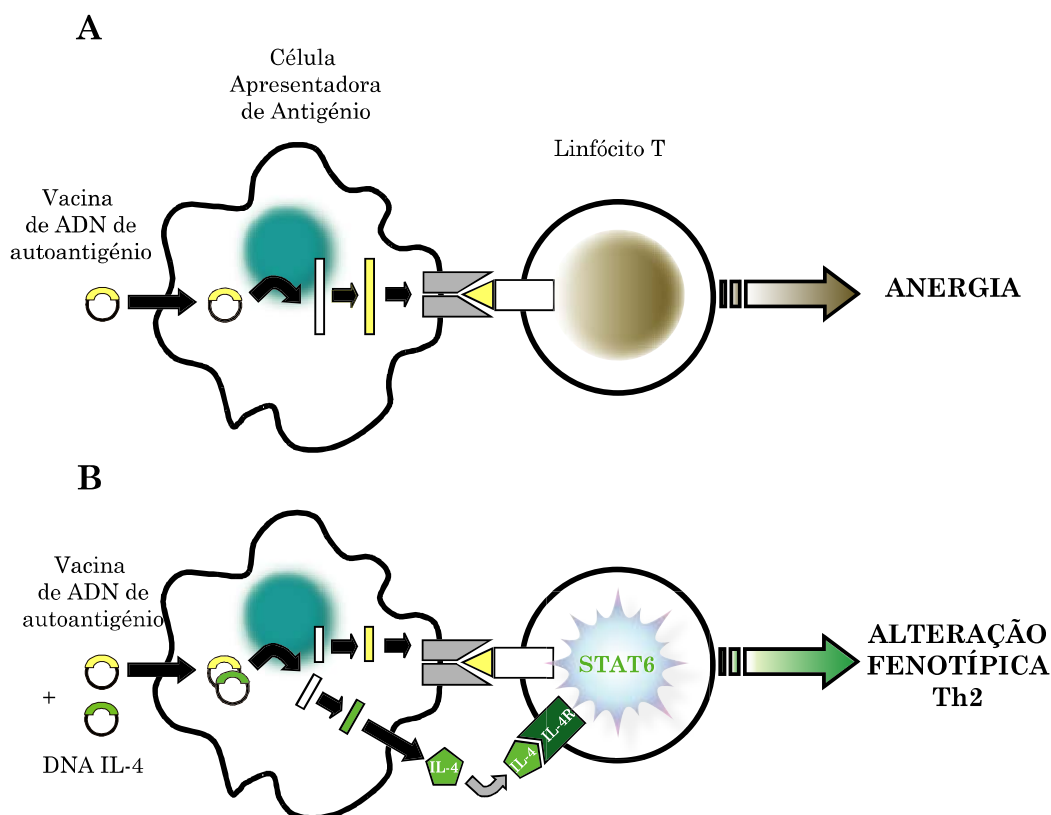


Figura 1. Paradigmas dos mecanismos de acção da vacinação com ADNc de proteínas do próprio. A. Vacinação supressora – a vacinação com ADNc codificador de um autoantígeno leva, na ausência de co-estimulação apropriada, à anergia dos linfócitos T auto-reactivos, com consequente supressão da resposta autoimune. B. Vacinação tolerizadora – a administração conjunta de ADNc codificador de autoantígeno e de uma citocina Th2 leva ao enviesamento da resposta linfocitária. O ADNc da citocina (IL-4) é transcrito em proteína funcional que, actuando através do seu receptor específico (IL-4R), induz uma alteração fenotípica.

No seguimento destas experiências iniciais de prevenção, decidimos explorar o potencial das vacinas de ADN como terapêutica na EAE estabelecida, um modelo muito mais relevante para o desenvolvimento de terapias para a EM. Uma vez mais, a co-vacinação com os constructos MOG e IL-4 teve eficácia na supressão da doença estabelecida (38) – um resultado charneira, dado que foi a primeira ocasião reportada em que uma vacina de ADN teve eficácia no tratamento, por oposição à prevenção, da EAE, abrindo o campo para a utilização desta tecnologia no tratamento da EM. Procurando expandir estes resultados, resolvemos testar a vacinação antígeno-específica no tratamento do modelo de EAE crónica com surtos em

ratinhos SJL/J. Neste modelo, no entanto (tal como, presumivelmente, na EM), outras dificuldades *a priori* poderiam opor-se à eficácia potencial desta estratégia terapêutica. Particularmente importantes, do ponto de vista imunológico, seriam o fenómeno da diversificação de epítomos, e a ausência de um antígeno dominante universal na população de doentes com EM (como comentámos no Cap. II). Por outro lado, o desenvolvimento da tecnologia de *spotted arrays* no nosso laboratório, destinada à detecção multiplex de autoanticorpos (39, 40), levou-nos à identificação de um fenómeno até então não descrito na EAE, nomeadamente, a diversificação de epítomos da resposta humoral. Os nossos resultados mostram que na EAE induzida em ratinhos SJL/J com homogeneizado de medula espinhal, PLP139-151 ou MBP85-99, existe uma diversificação progressiva da resposta humoral do antígeno indutor para múltiplos outros antígenos de mielina, e, também, que o grau dessa diversificação prediz o curso clínico subsequente e está relacionado com a taxa de surtos (41). Em face destas dificuldades, decidimos empregar uma estratégia de vacinação multigénica, para a qual desenvolvemos uma combinação de vacinas de ADN codificadoras de antígenos *major* da mielina – MBP, PLP, MOG, MAG -, à qual juntámos a vacina IL-4. O uso terapêutico desta combinação multigénica resultou, em mais do que um caso, numa redução apreciável da taxa de surtos, até cerca de 65% em comparação ao grupo controlo não tratado (41). A combinação mais eficaz continha todos os ADNs de proteínas de mielina associados ao da IL-4; a ausência da IL-4 reduziu, significativamente, a eficácia, e, ainda mais, a vacinação com, apenas, a vacina PLP139-151 e IL-4 (41). O efeito terapêutico da vacinação não se exerceu através da supressão da capacidade proliferativa das células T e, tal como já comentámos, ocorreu um enviesamento Th1 paradoxal, que interpretámos como efeito adverso inesperado e não associado ao mecanismo de acção. No entanto, quando estudámos a evolução da resposta humoral, utilizando *arrays*, constatámos que existia uma correlação directa entre a eficácia das várias combinações de vacinas com a redução da diversificação da resposta de anticorpos contra antígenos de mielina (41). Em resumo,

comprovámos que a vacinação multigénica com ADN tinha eficácia terapêutica na redução da taxa de surtos (um resultado muito semelhante aos obtidos com as melhores terapias actualmente empregues na EM, e mesmo numericamente superior), e que essa redução estava relacionada com a supressão da diversificação da resposta B autoimune. No modelo-padrão da EM (descrito no Cap. I), a diversificação de epítomos poderá ser o substrato imunopatogénico do aparecimento de surtos; o efeito observado sobre a resposta B após a vacinação com ADN, assumindo a concordância das respostas B e *T_{helper}* a nível macromolecular (mesmo que a especificidade fina seja diferente), significaria que a eficácia da vacinação multigénica na redução da taxa de surtos seria resultado da tolerização obtida contra os antígenos presentes nas vacinas, ou seja, da supressão da diversificação da resposta imune.

A ausência de efeitos terapêuticos da vacinação multigénica sobre a gravidade clínica da doença, ou sobre a incapacidade a longo termo, bem como o enviesamento Th1 encontrado, eram provas de que seria necessário melhorar esta estratégia de vacinação para garantir a sua eficácia a longo termo. Achamos, sobretudo, que a presença inevitável de motivos CpG nos vectores de vacinação seria um entrave à administração crónica de vacinas de ADN em doenças autoimunes. Enquanto que a presença de motivos CpG no vector garante a adjuvanticidade das vacinas de ADN, e o microambiente inflamatório assim criado poderá ter importância para a geração da resposta imune, a administração de motivos CpG em grande quantidade e durante um período considerável traz, em nossa opinião, desvantagens consideráveis. Assim, embora nos trabalhos de LOBELL *et al.*, ou no de BOCCACCIO *et al.*, os motivos CpG fossem considerados importantes, em nossa opinião tal deve-se ao facto de que, nas suas experiências, as vacinas foram sempre administradas em dose única preventiva, e não como terapia crónica. Fosse esse o caso, julgamos que os efeitos benéficos dos CpG reportados por estes autores não seriam tão evidentes. De forma a contrariar o efeito estimulador dos CpG, utilizámos oligonucleótidos sintéticos GpG, cuja presença tem efeitos antagonísticos *in vitro* e *in vivo*

sobre os CpG (15). A modificação isolada de um único nucleótido no motivo CpG (C>G) resulta na abolição dos seus efeitos imunoestimuladores sobre as APC e linfócitos T encefalitogénicos, bem como na estimulação de linhas celulares Th2; a administração de GpG no modelo de EAE crónica em ratinhos SJL/J tem efeitos benéficos, quer na protecção contra o aparecimento de doença após indução, quer no tratamento da doença estabelecida (15).

O seguimento lógico do desenvolvimento das sequências imunomoduladoras GpG (realizado por Peggy HO no nosso laboratório) era a sua combinação com a vacinação multigénica, conseguindo, dessa forma uma sinergia terapêutica entre estas duas estratégias. As experiências por nós realizadas combinando estas duas formas de terapia (vacinas de ADN e oligonucleótidos GpG) confirmaram um aumento substancial de eficácia clínica e histológica no tratamento da EAE crónica estabelecida, em modelos com e sem surtos (42). Quando comparada com os grupos de controlo tratados com cada uma destas terapêuticas separadamente, bem como com grupos tratados com vacinação multigénica sem adição de IL-4, ou com oligonucleótidos CpG e controlo, a combinação de vacinas de ADN contendo todos os antígenos de mielina e IL-4 conjuntamente com GpG resultou numa melhoria da taxa de surtos, da gravidade da doença e da incapacidade a longo termo, o que, anteriormente, não havia sido conseguido (42). Do ponto de vista mecanístico, esta combinação terapêutica resultou numa maior redução da diversificação de epítomos da resposta humoral; a isotipagem destes anticorpos revelou, também, uma conversão para uma resposta mais imatura (traduzida pela maior quantidade de IgM) e mais Th2 (IgG1) do que com as restantes terapias. Tal como anteriormente, a vacinação terapêutica não teve influência sobre a proliferação linfocitária T; por outro lado, o enviesamento fenotípico Th1, encontrado com o uso de cada uma destas terapias separadamente, foi, na sua associação, transmutado numa resposta Th2 clara (42). Com base nestes resultados, propusemos uma modificação ao mecanismo de acção acima descrito para a vacinação tolerizadora, na sua combinação com os oligonucleótidos GpG. A vacinação

com ADN conferiria o carácter antigénio-específico à terapêutica, potenciando a criação de clones T anti-mielina de fenótipo Th2 a partir da população *naive*, enquanto que os oligonucleótidos GpG actuariam de forma não antigénio-específica, impedindo os efeitos pró-inflamatórios dos motivos CpG presentes no vector de vacinação, ao mesmo tempo que através da sua capacidade diferencial de estimular a proliferação de células Th2 levariam à expansão da população T gerada pela vacinação com ADN. Por outro lado, uma vez que, pelo menos *in vitro*, os GpG aumentam a expressão de CD1d por parte das APC, seria possível um aumento da apresentação de antigénios à população de células reguladoras NK-T (Figura 2). Não temos, neste momento, quaisquer dados de suporte para este último mecanismo de acção, como a confirmação da presença ou acções das células NK-T após vacinação com ADN. Existem, naturalmente, outras áreas em que gostaríamos de ter mais dados, por exemplo, no tratamento crónico da EAE-MOG em ratinhos C57BL/6 apenas com as vacinas MOG+IL4 (que provaram o seu sucesso em (38)), o uso de outras vias de administração de ADN (intradérmico ou perilinfático), o desenvolvimento de outras vacinas codificadoras de citocinas anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias, a detecção de anticorpos anti-IL-4 com o uso crónico desta vacina, e várias outras permutações de esquema terapêutico, dosagem e modelo experimental. Acima de tudo, gostaríamos de ter mais evidência de suporte para o modelo de acção por nós proposto para esta terapêutica.

O sucesso obtido por esta nova forma de terapia experimental no modelo experimental de EAE, bem como a sua segurança e reprodutibilidade ao longo dos vários anos em que foi desenvolvida no laboratório STEINMAN da Universidade de Stanford, no qual trabalhámos, e o potencial como terapia na EM, levaram ao estabelecimento de uma patente para a utilização de vacinas de ADN no tratamento de doenças autoimunes (43), bem como à criação, por outrem, de uma empresa de biotecnologia para realizar o seu desenvolvimento (Bayhill Therapeutics,

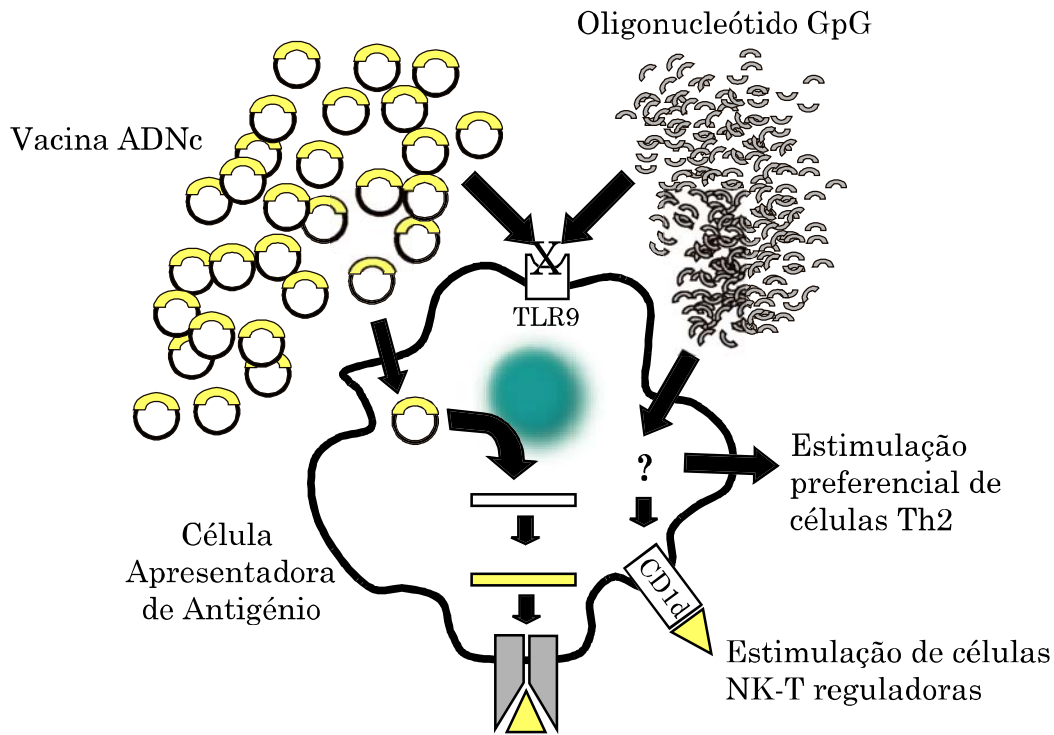


Figura 2. Combinação de vacinação tolerizadora com ADNc e oligonucleótidos imunomoduladores. Os oligonucleótidos GpG têm a capacidade de neutralizar a acção estimuladora sobre o receptor TLR9 dos motivos CpG presentes no plasmídeo de vacinação, reduzindo o potencial de enviesamento Th1. Por outro lado, actuando por mecanismos ainda não esclarecidos, os GpG induzem a proliferação preferencial de linfócitos Th2 e aumentam a expressão da molécula não-clássica de apresentação de antígeno CD1d. Por sua vez, esta molécula está implicada na apresentação antigénica a células NK-T reguladoras.

Palo Alto, Califórnia, EUA). Desde então, a vacinação com ADN passou por uma fase de experimentação animal na qual foi testada em combinação com outra terapia não antígeno-específica emergente, as estatinas. Tem sido grande o interesse gerado por estes fármacos, e a sua eficácia comprovada no tratamento da EAE, bem como em ensaios piloto na EM (44-48). O modo de acção destes fármacos, embora ainda não completamente desvendado, tem sido progressivamente esclarecido; inicialmente, os efeitos sobre as células apresentadoras de antígeno, como a redução da apresentação de antígenos por diminuição das moléculas de MHC classe II, e o enviesamento Th2 da resposta linfocitária resultante foram apontados como

responsáveis pelos efeitos imunomoduladores destes fármacos (44). Mais recentemente, múltiplas alterações da sinalização intracelular provocadas pelas estatinas foram associadas a novos mecanismos de acção: redução da expressão de VCAM-1 e E-selectina pelas células endoteliais, em virtude da inibição da via fosfatidilinositol-3-quinase/Akt/NF- κ B (49); aumento permanente da fosforilação da ERK1, causando anergia das células T (50); redução nos isoprenóides da via do mevalonato com compromisso da via RhoA/Ras/p38/c-Fos, o que, na presença de estimulação de células T *naive* através do TCR, leva à sua diferenciação Th2 (51). A combinação das estatinas com outras formas de terapêutica da EM é, naturalmente, uma possibilidade interessante, sobretudo para a exploração de sinergias potenciais; recentemente, foi publicado um ensaio experimental em que a combinação da atorvastatina com o acetato de glatiramero teve efeitos benéficos no tratamento da EAE (52).

Após ensaios experimentais positivos de combinação da vacina PLP com atorvastatina no tratamento da EAE crónica em ratinhos SJL/J (53), foi iniciado em 2004 um programa de desenvolvimento clínico desta forma de terapia combinada (programa BHT-3009). Até este momento, foi realizado um ensaio clínico de fase I/II da utilização de uma vacina contendo o ADNc da MBP em monoterapia ou em combinação com atorvastatina, cujos resultados foram apresentados na última reunião da *American Academy of Neurology* em 2006. Neste ensaio randomizado, duplamente cego e controlado por placebo, realizado em quatro centros nos EUA e Canadá durante 13 semanas^f, foram tratados 30 doentes com EM, dos quais 20 terminaram já o ensaio (16 mulheres, 11 doentes com surtos, 9 sem surtos, EDSS médio 4.4); a finalidade deste ensaio foi de averiguar a segurança da terapia e os seus efeitos imunomoduladores. A vacina MBP foi administrada intramuscularmente nas semanas 1, 3, 5 e 9 (três dosagens de 0.5, 1.5 e 3 mg), e foram dados 80 mg de atorvastatina oral diariamente. No que respeita à segurança, não foram observados efeitos adversos significativos, nomeadamente o aparecimento de anticorpos anti-ADN ou antinucleares

^f Barrow Neurological Institute (Tim Vollmer), Montreal Neurologic Institute (Jack Antel), University of Southern California (Leslie Weiner), University of British Columbia (Joel Oger)

(54). No que respeita à sua eficácia terapêutica, a administração da vacina MBP teve, como efeito, a supressão da capacidade proliferativa de clones Th1 anti-MBP; num doente, a proliferação de clones IFN γ + anti-MBP83-99 diminuiu de 25.9% para 1.2%, noutro de 13.3% para 5.4%, e, num terceiro, a proliferação de clones anti-MBP IFN γ + diminuiu de 2.27% para 0.79% (55). A avaliação da resposta linfocitária B por *protein microarrays* revelou que, em dois doentes com níveis elevados de anticorpos anti-mielina no líquido cefalorraquidiano (sobretudo anti-MOG e PLP), o tratamento com BHT-3009 levou à sua redução (56). Por último, foi estudado o efeito terapêutico desta medicação sobre medidas imagiológicas de actividade da doença (avaliadas por Ressonância Magnética Nuclear do neuro-eixo), tais como a carga lesional em T2 e o número de novas lesões com captação de contraste. Para ambas as medidas, a administração de BHT-3009, com, ou sem, atorvastatina, resultou numa tendência para a sua melhoria (56).

Aguarda-se, ainda, a publicação dos resultados completos deste primeiro ensaio clínico de vacinação de ADN anti-mielina na EM, antes que se possam tirar conclusões definitivas sobre a eficácia e segurança desta terapêutica, bem como sobre o contributo específico de cada uma das terapias usadas em combinação. Os resultados positivos encontrados, no que respeita à avaliação da resposta autoimune anti-mielina, e da avaliação imagiológica, devem ser encarados com optimismo cauteloso, dado o número reduzido de doentes estudados. Com base nos resultados positivos deste ensaio de fase I/II, um ensaio de fase II mais alargado foi iniciado em 2006, encontrando-se em fase de recrutamento de doentes.

As alternativas imunoterapêuticas actualmente aprovadas para utilização na EM, deixam largas margens para melhorias; na sua maioria, trata-se de fármacos imunomoduladores, ou imunossuppressores inespecíficos, com eficácia parcial e efeitos adversos potencialmente graves. A única forma de terapia baseada em antigénios é constituída pelo acetato de glatiramero; por muito que o seu mecanismo de acção seja intelectualmente atractivo, sobretudo a partir do momento em que começou a ser encarado como um “ligando peptídeo universal” e como estimulando a

neuro-regeneração, os seus efeitos biológicos *in vivo*, *i.e.* a sua eficácia no tratamento da EM é limitada, e, para as formas crónicas, inexistente. Mais ainda, tem-se tornado cada vez mais manifesta a heterogeneidade de resposta a estas terapias entre doentes, dependente de múltiplos mecanismos, entre os quais os componentes da resposta imune associados ao *background* genético do indivíduo. Os padrões de resposta genómica à terapia da EM estão actualmente a ser investigados com interesse, em vista de descobertas que possam auxiliar à personalização da terapêutica nestes doentes. Mesmo assim, no entanto, os fármacos disponíveis não têm potencial adaptativo ou de personalização; como mencionámos anteriormente (Cap. III), o mais que poderemos fazer, neste momento, será identificar bons e maus candidatos para uma determinada terapia, mas sem termos novas alternativas para oferecer. Existem, certamente, vários fármacos imunomoduladores em fase avançada de desenvolvimento, o que justifica algum optimismo em relação ao futuro da terapêutica desta doença, e nos próximos anos teremos, provavelmente, mais algumas armas no nosso arsenal terapêutico. Apesar disso, a maioria destes novos fármacos têm efeitos sistémicos sobre o Sistema Imune, acarretando, como tal, riscos de efeitos adversos potencialmente severos, muitas vezes inaparentes no início, tal como aconteceu, recentemente, com o anticorpo monoclonal anti-integrina $\alpha 4$, natalizumab. A focalização terapêutica antigénio-específica nas doenças autoimunes, e imunomediadas, evita estes riscos associados à manipulação sistémica da imunidade, e, teoricamente, deveria ser capaz de regularizar a resposta imune, eliminando a auto-reactividade patológica, sem, com isso, afectar o restante funcionamento do Sistema Imune. Este tipo de estratégia terapêutica tem sido largamente eficaz no tratamento dos modelos experimentais de autoimunidade, não só da EM, como de várias outras patologias; a sua transferência destes modelos para as doenças humanas, no entanto, não tem tido igual medida de sucesso. De facto, de todas as terapias antigénio-específicas, que discutimos, resumidamente, neste trabalho, encontram-se, ainda, em desenvolvimento clínico apenas os copolímeros (acetato de glatiramero e novos polímeros), a vacinação com

células T ou com péptidos do TCR, e as vacinas de ADN. A tolerização oral com mielina foi abandonada, após um ensaio clínico negativo mas que, em nossa opinião, em virtude do efeito placebo desmesurado, e da dosagem baixa de fármaco testada, justificava a continuação dos ensaios. De igual modo, o processo de desenvolvimento clínico dos ligandos peptídeos alterados da MBP, e a terminação prematura do ensaio de fase II/b este ano, foi uma derrota do desenho racional de fármacos pelo desenho irracional de ensaios. Que este fármaco tinha efeitos biológicos reais sobre a doença é inquestionável, influenciando a resposta imune anti-mielina de forma benéfica, desde que em dosagem baixa. Para as dosagens mais elevadas, o extremar estes efeitos biológicos era potencialmente patogénico, resultando num enviesamento paradoxal da resposta imune de efeitos deletérios. A tentativa de evitar esses efeitos adversos no ensaio de fase II/b levou à utilização de uma dosagem demasiado baixa para ser eficaz, perdendo-se, assim, a oportunidade de verificar o potencial terapêutico deste fármaco. Não é a primeira, nem será, certamente, a última vez, que a pressão sentida pela indústria farmacêutica e de biotecnologia, e o custo crescente da realização de ensaios clínicos, leva a escolhas não-rationais no testar de novos fármacos.

Ao contrário das outras alternativas terapêuticas baseadas em antígenos, as vacinas de ADN têm as vantagens da simplicidade técnica, e da rapidez de manipulação e modificação, permitindo, como tal, a sua personalização e optimização para cada doente. Mais ainda, a possibilidade de utilizar estratégias de vacinação multigénica, ou de co-vacinação com ADNc de mediadores da resposta imune, como citocinas ou quimiocinas, tem o potencial de evitar a diversificação de epítomos da resposta adaptativa, ou de influir sobre a sua evolução de mais do que uma maneira. A terapêutica imunomoduladora contra vários antígenos, simultaneamente, é muito mais simples de realizar com a tecnologia de vacinação de ADN, do que com qualquer outra das formas de terapia antígeno-específica: a administração de proteínas de mielina ou ligandos peptídeos alterados necessitaria de métodos de síntese ou purificação de proteínas, para além dos estudos

necessários à criação de ligandos para os vários antígenos-alvo; a vacinação com células T é morosa, tecnicamente complicada, e dificilmente convertível à escala supra-individual; a vacinação anti-TCR esbarra na grande diversidade de alvos potenciais, uma vez que a resposta T anti-mielina não exibe a restrição de repertório necessária. Para além destas vantagens – simplicidade técnica, adaptabilidade e personalização –, a vacinação com ADN parece ser, igualmente, muito segura. De facto, uma das lições extraídas dos ensaios de vacinação antimicrobiana com ADN é a relativa falta de imunogenicidade destas vacinas, necessitando, frequentemente, de reforços para estabelecer imunidade duradoura (estratégias *prime-boost*). Assim, enquanto que a utilização de proteínas ou péptidos acarreta o potencial, pelo menos nas dosagens mais elevadas, de estimular respostas imunes deletérias, a fraca imunogenicidade das vacinas de ADN poderá ser uma característica de segurança intrínseca, especialmente quando usadas com oligonucleótidos imunomoduladores desenhados para contrabalançar os efeitos adjuvantes dos motivos CpG presentes nos vectores de vacinação. Para o tratamento de doenças autoimunes, associadas a uma resposta celular Th1, a utilização combinada de vacinas de ADN como estímulo antígeno-específico de baixa intensidade, e de oligonucleótidos imunomoduladores com capacidade anti-inflamatória, poderá resultar numa modificação benéfica, e duradoura, da resposta autoimune.

A vacinação com ADN é a última iteração no desenvolvimento de terapias antígeno-específicas, que conta, já, com uma longa história no que respeita à EAE e à EM. Se compararmos o estado do conhecimento sobre estas doenças na época em que RIVERS, FERRARO e CAZZULLO, ou KABAT e MORGAN primeiro estabeleceram o modelo experimental em bases firmes, com o actual edifício científico erigido, em grande parte, sobre estas mesmas bases, é notável o progresso realizado na compreensão dos mecanismos intrínsecos destas doenças. Apesar disso, o progresso terapêutico tem sido lento em comparação com este avanço científico. Ao longo dos últimos quase 60 anos, as terapias antígeno-específicas, desde as primeiras tentativas de FERRARO e CAZZULLO na EAE, sofreram grande

evolução, demonstraram o seu potencial de influenciar, eficazmente, o curso desta doença autoimune experimental, e levam-nos a crer no ideal de que modificar selectivamente a resposta imune deletéria seria, também, possível nas doenças autoimunes humanas. No entanto, como já referimos ao longo deste trabalho em mais do que uma ocasião existe, ainda, um grande fosso entre os nossos conhecimentos da imunopatologia do modelo experimental EAE, e a compreensão de uma doença complexa como é a Esclerose Múltipla. O viés antigénico, inerente a qualquer modelo experimental de autoimunidade, e que torna a terapêutica antigénio-específica relativamente simples, parece ser inexistente na população com Esclerose Múltipla, pelo que deve ser usada cautela no plasmar indiscriminado de conceitos ou resultados entre estas duas entidades distintas. Em virtude de tudo o que ficou anteriormente exposto em relação às vacinas de ADN, dos nossos resultados e os de outros grupos a trabalhar no mesmo campo, julgamos que esta forma de terapia antigénio-específica tem grandes potencialidades; esperamos que o seu processo de desenvolvimento clínico seja harmonioso e sustentado, e que os erros e as dificuldades, anteriormente encontrados na investigação de outras formas de terapia similares, nos tenham ensinado a prever e evita-los, de maneira a que a vacinação com ADN se torne numa alternativa terapêutica relevante, viável e eficaz para o tratamento das doenças desmielinizantes primárias como a Esclerose Múltipla.

Animal	Tipo Clínico	Estratégia	Vacina de ADN	Resultado	Referência
Ratinho PL/J	Crônica	Prevenção	TCR V β 8.2	Melhoria	Waisman 1996 (16)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	MIP1 α MCP-1 MIP1 β RANTES	Melhoria Melhoria Agravamento Sem efeito	Youssef 1998 (2)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	MBP68-85	Melhoria	Lobell 1998 (23)
Ratinho SJL/J	Crônica	Prevenção	PLP, PLP139-151, PLP178-191	Agravamento	Tsunoda 1998 (28)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	Vector vazio MBP	Melhoria Melhoria	Boccaccio 1999 (13)
Ratinho SJL/J	Crônica com surtos	Prevenção	PLP139-151, PLP178-191, PLP139-151 L/R	Melhoria	Ruiz 1999 (37)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	MBP68-85 com vector modificado IL-4, IL-10, TNF, GM-CSF	Melhoria	Lobell 1999 (9)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	MIP-1 α MCP-1	Melhoria	Youssef 1999 (3)
Ratinho SJL/J (induzido com TMEV-IDD ou EAE)	Crônica com e sem surtos	Prevenção	Vector vazio	Agravamento	Tsunoda 1999 (14)
		Prevenção	TNF	Melhoria	Wildbaum 1999 (4)
Ratinho SJL/J	Crônica com surtos	Prevenção	MOG	Agravamento	Bourquin 2000 (30)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	Ligando Fas (CD95L)	Melhoria	Wildbaum 2000 (5)
Ratinho SJL/J	Crônica com surtos	Prevenção	PLP	Agravamento ou melhoria	Selmaj 2000 (31)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	TCR V β 8.2 e V β 10	Melhoria	Matsumoto 2000 (20)
Rato Lewis	Aguda	Prevenção	MBPgp68-85 MBPrat68-85 MBP89-101 MBPrat21.5	Melhoria	Weissert 2000 (24)
Ratinho SJL/J	Crônica com e sem surtos	Prevenção	PLP139-151 + IL-4	Melhoria	Garren 2001 (38)
Ratinho C57BL/6	Aguda,	Tratamento	MOG + IL-4		
Rato Lewis	crônica com surtos	Prevenção	IP-10	Melhoria	Wildbaum 2002 (1)
Ratinho B10.PL	Crônica	Prevenção	TCR V β 8.2	Melhoria	Kumar 2001 (19)
Rato Lewis congênico LEW.1AV1; Rato DA	Aguda	Prevenção	MOG91-108	Melhoria	Lobell 2003 (25)
Rato DA	Crônica	Prevenção	TCR V β 10 e V β 15	Melhoria parcial	Miyakoshi 2003 (21)
Ratinho SJL/J	Crônica com surtos	Prevenção	Oligodeoxinucleótido GpG (ODN)	Melhoria	Ho 2003 (15)
Ratinho SJL/J	Crônica com surtos	Tratamento	PLP, MOG, MBP, MAG + IL-4	Melhoria da taxa de surtos	Robinson 2003 (41)
Ratinho SJL/J	Crônica com e sem surtos	Prevenção	PLP	Melhoria ou agravamento	Walczak 2004 (32)
Rato Lewis congênico LEW.1AV1	Aguda	Prevenção	MOG MOG91-108	Melhoria Melhoria	Wefer 2004 (27)
Rato DA	Crônica	Prevenção	TWEAK	Agravamento	Mueller 2005 (7)
Ratinho B10.PL	Crônica	Prevenção	TCR V β 8.2	Melhoria	Kwon 2005 (22)
Rato DA	Crônica	Prevenção	CCR2 e CXCR3	Melhoria parcial	Matsumoto 2005 (6)
Ratinho SJL/J	Crônica com e sem surtos	Tratamento	PLP, MOG, MBP, MAG + IL-4 + GpG ODN	Melhoria	Ho e Fontoura 2005 (42)

Tabela 1. Experiências de prevenção e tratamento da EAE com vacinas de ADN e oligodeoxinucleótidos.

2. Identificação da proteína Nogo-A como novo autoantigénio na Encefalomielite Autoimune Experimental. Discussão dos resultados, revisão da literatura e implicações para a fisiopatologia da Esclerose Múltipla.

A identificação dos alvos antigénicos com importância fisiopatológica no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental, e, potencialmente, também, na Esclerose Múltipla é um passo indispensável para o desenvolvimento de novas terapias antigénio-específicas. Tal como descrevemos nos Capítulos I e II, ao longo do século anterior foram sendo progressivamente identificados vários componentes proteicos da bainha de mielina contra os quais se pode demonstrar a presença de uma reacção imune com potencial significado patogénico. De entre estes, a proteína básica de mielina (MBP), a proteína proteolipídica (PLP) e a glicoproteína oligodendrocitária da mielina (MOG) têm assumido particular importância. Como vimos, nos numerosos estudos realizados no modelo experimental, e nos doentes com EM, os detalhes da resposta imune contra estes antigénios foram, já, amplamente elucidados: os determinantes antigénicos para cada espécie e estirpe, a associação com antigénios HLA, a restrição TCR, o tipo de resposta imune induzida, e, mesmo, alguma correlação com o fenótipo clínico. No que respeita aos outros componentes da mielina, descrevemos, resumidamente, no Capítulo I que, para vários outros componentes proteicos *minor* da mielina, é presumido algum papel dentro da fisiopatologia da doença. Mais ainda, foram recentemente identificadas respostas imunes contra componentes lipídicos da bainha de mielina, cuja importância antigénica havia sido, até agora, praticamente negligenciada na literatura coeva. Estas respostas imunes, predominantemente humorais, parecem interessar sobretudo aos sulfátidos, esfingolípidos e lípidos oxidados em doentes com EM, e estar associadas à gravidade da doença (57); por exemplo, a administração de anticorpos anti-sulfátidos levou ao agravamento clínico do modelo de EAE, induzida em ratinhos SJL/J (57). Por outro lado, foram identificados anticorpos IgM anti-lipídicos (sobretudo

anti-fosfatidilcolina) no LCR de doentes com EM e com surtos clínicos isolados, cuja presença poderá estar relacionada com o prognóstico clínico e a evolução da doença, como, por exemplo, com a passagem de SCI a formas definitivas de EM (58). Assim sendo, e dada a abundância qualitativa e quantitativa destes componentes, poderá ter sido aberta uma nova janela de oportunidade e uma nova área de investigação para os mecanismos neuro-inflamatórios, nesta e noutras doenças do SNC. Lembremo-nos, para dar apenas um exemplo, da presença de infiltrados inflamatórios nas lesões dismielinizantes da adrenoleucodistrofia, que tem levado à suspeição de um mecanismo neuroinflamatório subjacente (59-61).

A declaração de um novo autoantígeno associado à Esclerose Múltipla pressupõe a existência de evidência experimental que confirme a sua importância no modelo experimental e também nos casos clínicos. Para o modelo experimental, pretende-se a identificação de respostas imunes antígeno-específicas – *i.e.* respostas linfocitárias T e B – e evidência clínica e histológica da sua encefalitogenicidade. Julgamos que os dados por nós obtidos, no conjunto de experiências descrito no Capítulo VI, são prova suficiente de que existem determinantes antigénicos na região Nogo-66 com capacidade de induzir potentes respostas linfocitárias T e B, que estas respostas são antígeno-específicas e variáveis entre as diversas estirpes de ratinho testadas consoante o seu haplótipo H-2, e que, em algumas estirpes, é possível induzir, experimentalmente, sinais clínicos e histológicos de neuroinflamação, consistentes com o diagnóstico de EAE. Mais ainda, utilizando linhas linfocitárias T anti-Nogo com fenótipo Th2 é possível transferir, adoptivamente, protecção contra a EAE e tratar doença induzida com outros antígenos. No que respeita à EM, até ao momento só foi possível detectar a presença de anticorpos anti-Nogo em alguns doentes, sem que este estudo tenha sido ainda replicado. Mais adiante discutiremos o significado dos nossos resultados, comparando-os com outros estudos de indução de imunidade contra a proteína Nogo, bem como as possibilidades de detecção de respostas linfocitárias T em doentes com EM.

A incapacidade de regeneração das lesões do Sistema Nervoso Central (SNC) é um facto amplamente reconhecido, e uma barreira inexpugnável contra a qual embatem, sem esperança de sucesso, todas as estratégias terapêuticas. O reconhecimento da existência de precursores neuronais abundantes, mesmo no SNC do adulto, bem como a demonstração *in vitro* da capacidade de neurónios adultos regenerarem os seus prolongamentos, associada à indiscutível capacidade de regeneração axonal nas lesões do Sistema Nervoso Periférico (SNP), levam a pensar que não é a falta de capacidade regenerativa mas, sim, a presença de algum factor, ou factores, inibitórios, que impedem, realmente, a reparação das lesões no SNC. De facto, a presença de inibidores da regeneração axonal na mielina foi suspeitada por RAMON Y CAJAL quase desde o início da doutrina neuronal (revisto em (62)), mas foi somente a partir dos anos 1980 que surgiram os primeiros dados experimentais de apoio a esta hipótese: BERRY e, mais tarde, CRUTCHER, demonstram, *in vitro*, que a capacidade de crescimento axonal é limitada na presença de substância branca cerebral, quer sob a forma de detritos pós-traumáticos, quer em cortes histológicos intactos (63, 64). Sabemos, hoje em dia, que o problema da regeneração axonal não se limita à presença de inibidores associados à mielina; de facto, de entre os vários factores inibidores associados à mielina, glia, e à própria cicatriz das lesões do SNC, encontram-se os proteoglicanos condroitina-sulfato (neurocan, brevican, fosfacan, tenascina e NG2), as efrinas, os inibidores associados à mielina MAG, Nogo e OMgp, e as semaforinas (revisto recentemente em (62, 65)). Como tal, qualquer estratégia terapêutica destinada a promover a regeneração axonal terá, inevitavelmente, de ser capaz de superar não uma, mas várias barreiras ao recrescimento axonal; o cenário mais provável será, portanto, o de uma combinação de várias terapêuticas, cada uma destinada a um alvo específico, e aplicadas ou em simultâneo, ou sequencialmente.

O primeiro dos elementos inibitórios da mielina a ser identificado foi a glicoproteína associada à mielina, MAG, por MCKERRACHER (66) e MUKHOPADHYAY (67); no entanto, o facto da ausência desta proteína em

animais *knockout* não eliminar a capacidade inibidora da mielina (68), implicava a existência de outros factores impeditivos. De igual modo, a MAG parece ter capacidades bifuncionais como inibidor/promotor do crescimento axonal, consoante a idade do neurónio; por último, a sua presença no SNP bem como no SNC torna-a menos específica, e põe em causa a sua real importância como inibidor, dada a capacidade de regeneração das lesões do nervo periférico (revisto em (62)). Já anteriormente a esta descoberta, no entanto, CARONI e SCHWAB tinham iniciado o que iria ser uma longa e sistemática procura desses elementos inibitórios. Utilizando um ensaio de crescimento axonal com fibroblastos 3T3 na presença de componentes da substância branca cerebral normal, estes investigadores foram capazes de identificar os inibidores como pertencentes à fracção proteica (dada a sua sensibilidade às proteases). Após uma técnica de fraccionamento de tamanho, por electroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), a capacidade inibitória foi atribuída a duas fracções proteicas *minor* com pesos moleculares de 35kD e 250kD (NI-35 e NI-250). A sua remoção da mielina do SNC tornava este substrato permissivo à regeneração, enquanto que a sua junção a extractos proteicos de mielina do Sistema Nervoso Periférico, normalmente permissiva, tornava-a altamente inibidora (69). O mesmo fenómeno inibitório na presença de oligodendrócitos, ou de mielina do SNC, foi observado com culturas de neurónios primários ou células de neuroblastoma (66, 70, 71). Posteriormente, a eliminação experimental da mielina na medula espinhal ou nervo óptico, por irradiação com raios-X, tornou estes substratos permissíveis à regeneração axonal de longa distância (72, 73). Por outro lado, o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal, denominado IN-1, contra a fracção mielínica de 250kD do rato (NI-250), permitiu bloquear a sua capacidade inibitória *in vitro*, bem como a da fracção NI-35 (74, 75). Mais ainda, este anticorpo IN-1 permitiu localizar, por imunohistoquímica, o seu alvo antigénico à mielina do SNC (76). Empregando a mesma estratégia de isolamento à mielina bovina, e confirmando os seus resultados através da inibição pelo anticorpo IN-1, SPILLMAN *et al.*, conseguiram identificar e

caracterizar uma fracção proteica inibidora bNI-220, para a qual obtiveram sequências peptídicas parciais (77). A partir destas sequências parciais, foram estabelecidas homologias com bases de dados e colecções de ADNc de rato, que levaram, finalmente, ao fim de 12 anos de trabalho, ao isolamento de um gene do rato, denominado *nogo*, que origina três transcritos proteicos diferentes, Nogo-A (1163 aminoácidos), Nogo-B (360 aminoácidos) e Nogo-C (199 aminoácidos) (78). Destes, a proteína Nogo-A foi localizada à mielina do SNC e demonstrou capacidades inibidoras do recrescimento axonal *in vitro*, de acordo com o esperado. Utilizando estratégias semelhantes, dois outros grupos conseguiram chegar, quase em simultâneo, ao isolamento da mesma proteína no homem, e à sua caracterização como um membro da família Reticulon, sendo os seus resultados publicados em simultâneo com os do grupo de SCHWAB em 2000 (79, 80). O isolamento deste novo inibidor do recrescimento despertou um enorme interesse, sobretudo pela sua especificidade para o SNC, e pelo potencial de indução de regeneração através do seu bloqueamento (81-83).

A proteína Nogo-A identificada por estes grupos, é um membro da família Reticulon de proteínas, um grupo de mais de 300 proteínas identificadas em vários organismos eucarióticos (84, 85). Todas estas proteínas têm grande homologia no seu terminal carboxi, possuindo uma região de cerca de até 200 aminoácidos (*reticulon homology domain* RHD) consistindo de duas regiões hidrofóbicas flanqueando uma ansa de 66 aminoácidos (84). Na proteína Nogo-A, esta região, denominada habitualmente Nogo-66, tem sido implicada como a principal mediadora da sua capacidade de inibição regenerativa, e interage com um receptor próprio, NgR, o qual discutiremos adiante (86). No mamífero, existem 4 genes reticulon (*RTN1*, *RTN2*, *RTN3* e *Nogo/RTN4*) com capacidade de gerar uma diversidade de transcritos alternativos. A expressão destes genes é detectável numa grande variedade de tecidos, sendo que o *Nogo/RTN4* é expresso sobretudo nos oligodendrócitos, algumas subpopulações neuronais, no coração e no testículo (78, 84). Nestas células, a proteína Nogo-A está associada ao retículo endoplasmático rugoso (RER), bem como ao aparelho

de GOLGI, e encontra-se em pequenas quantidades na membrana plasmática dos oligodendrócitos e fibroblastos (84). O transcrito mais pequeno, Nogo-C, é, sobretudo, abundante no músculo, enquanto o transcrito Nogo-B é de expressão disseminada em vários órgãos (84). Ao longo da evolução, os genes *RTN* têm sido preservados de forma notável, e é possível identificar, mesmo em vertebrados com capacidade regenerativa axonal (como, por exemplo, nos peixes teleósteos), as mesmas regiões inibidoras presentes na proteína Nogo-A (85); este facto leva a pensar que a aquisição de funções inibidoras foi um fenómeno tardio na evolução destas proteínas. Outros papéis atribuídos às proteínas *RTN* incluem funções como poros ou complexos transportadores no RER, no transporte de componentes e tráfego membranário entre o RER, o aparelho de GOLGI, o endossoma, as vesículas sinápticas e a membrana celular, na estabilização estrutural do RER, ou mesmo na divisão celular (revisto em (84)).

Os estudos de topologia membranária realizados revelaram que a proteína Nogo-A pode assumir uma de duas conformações, dependendo da sua localização no RER ou na membrana plasmática; enquanto que no RER a ansa de 66 aminoácidos estaria virada para o interior deste organelo, na membrana poderia estar voltada para o exterior da célula (84, 86, 87). Mais ainda, o facto de que ambas as regiões hidrofóbicas do RHD poderem atravessar a membrana celular uma ou duas vezes, significa que seria teoricamente possível a ansa Nogo-66 e a região amino-terminal estarem localizadas no mesmo lado da membrana (87). Uma vez que as regiões inibitórias presentes na proteína Nogo-A correspondem, precisamente, à ansa Nogo-66 (sequência Nogo1024-1090 humana) e a uma curta sequência presente na região amino, denominada NiG (correspondente à sequência de ratinho Nogo544-725, ou Nogo567-748 humana) (78, 80, 84, 87), esta disposição membranária possibilitaria que ambas as estas regiões poderiam exercer as suas funções fisiológicas, mesmo sem a necessidade de haver destruição celular para serem libertadas. Um modelo parcial da estrutura secundária da região Nogo-66 foi recentemente publicado, com base em estudos de espectroscopia de ressonância magnética (88). Utilizando um

péptido artificial correspondente à sequência Nogo1-40, estes autores demonstraram a existência de duas hélices alfa correspondentes aos resíduos Nogo7-12 e 26-37, e, possivelmente, uma terceira nos resíduos 20-24; do ponto de vista electrostático, o término amino é predominantemente positivo, em contraste com o término carboxi, que é negativo (88).

O estudo da capacidade inibidora da proteína Nogo-A tem atraído, naturalmente, a atenção principal dos vários grupos de investigação nesta área. Logo desde a sua caracterização inicial, foram identificados os domínios inibidores putativos a que nos referimos acima, Nogo-66 e NiG (78, 79). São actualmente reconhecidos pelo menos três locais activos dentro desta molécula: a ansa Nogo-66, um domínio no centro do domínio específico da Nogo-A (fragmento 4-20), codificado pelo exão 3 do gene *nogo*, e alvo dos anticorpos bloqueadores desenvolvidos com capacidade de promoção da regeneração *in vitro*, e uma região no N-término comum à Nogo-A e B (87). Embora inicialmente a região NiG (dado que é específica da proteína Nogo-A, não se encontrando nas outras isoformas) tivesse assumido algum protagonismo, a identificação de um receptor específico para a ansa Nogo-66, o NgR (86, 89) levou à concentração dos esforços nesta região. Este receptor, identificado em 2001, e cuja estrutura foi descrita em 2003 (90, 91), é uma proteína com oito domínios LRR (*leucine-rich repeat*) e um local transmembranário de ligação ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), indicativo do seu papel potencial como membro de um complexo receptor de sinalização (86). O NgR é expresso predominantemente no cérebro, e localiza-se nos prolongamentos axonais dos neurónios, de acordo com o seu papel na mediação da plasticidade neuronal; após interacção com a ansa Nogo-66, o receptor NgR provoca o colapso dos cones de crescimento axonal através de regulação antagonista das GTPases RhoA e Rac1, com activação da primeira e supressão da segunda ((92), e revisto em (65, 93)). Estudos imunohistoquímicos confirmaram a localização adjacente deste par de ligando e receptor – Nogo-66 e NgR – na interface mielina-axónio, de acordo com a hipótese de que a sua interacção está implicada na inibição da regeneração axonal no SNC adulto (94). Outras duas proteínas homólogas

ao NgR em relação à estrutura primária, propriedades bioquímicas e padrão de expressão (e, como tal, receptores putativos) foram, também, identificados recentemente (NgRH1 e NgRH2), embora a sua função não esteja ainda totalmente esclarecida (95). Pelo menos um destes dois receptores, o NgRH1 (denominado actualmente NgR2) foi recentemente identificado como um receptor específico para a MAG, com maior afinidade que o NgR (NgR1), e de localização axonal (96). Com base na descrição da estrutura cristalográfica do NgR (90, 91), e na acima descrita estrutura secundária da ansa Nogo-66, é previsível que o N-terminal positivo da ansa se ligue a uma cavidade negativa no receptor; no entanto, a sinalização através deste receptor parece estar dependente do C-terminal da ansa, uma vez que a sequência artificial Nogo1-40, apesar da sua forte ligação ao receptor NgR, não induz inibição da regeneração (87, 88). Esta região negativa da ansa Nogo-66 poderá ligar-se a uma região positiva do receptor ainda desconhecida ou, em alternativa, a outro membro do complexo de sinalização.

Não foi, ainda identificado um receptor específico para a região NiG presente no N-terminal, apesar da sua importância aparentemente indiscutível. Ainda mais, para além da ansa Nogo-66, uma outra região de 24 aminoácidos contida no N-terminal (denominada Nogo-A-24) foi identificada como ligando de afinidade nanomolar para o NgR (97). Apesar de, por si só, esta região não possuir capacidade de inibição do crescimento axonal, em associação com a Nogo-66 transforma-se num superagonista para o NgR (97). Ou seja, pelo menos duas das regiões inibitórias da Nogo-A têm um modo de acção sinérgico e sinalização através do mesmo receptor.

A ausência de um domínio intracelular de sinalização no receptor NgR implicava, necessariamente, a existência de um, ou mais, co-receptores associados. O primeiro destes a ser identificado foi a proteína p75^{NTR}, até então reconhecida como um receptor de baixa afinidade para a família das neurotrofinas, e um membro da superfamília TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) (98, 99). A ausência deste co-receptor torna o NgR incapaz de activar ou inibir as GTPases intracelulares e, portanto, de desempenhar as

suas funções (98). No entanto, a co-expressão experimental de NgR e p75 induzida em células não-neuronais COS-7 não foi suficiente para as tornar sensíveis aos efeitos dos ligandos para o receptor NgR, levando à conclusão de que deveria haver algum outro co-receptor neste complexo de sinalização, que só estaria presente em células de linhagem neuronal. De facto, foi possível identificar uma proteína específica do SNC e associada ao NgR, denominada LINGO-1 (*LRR and Ig domain containing, Nogo receptor interacting protein*), que seria o terceiro elemento deste complexo de sinalização, uma vez que a sua expressão conjuntamente com o NgR/p75 era suficiente para tornar as células COS-7 sensíveis (100). Esta proteína veio a ser identificada, muito recentemente, como um regulador negativo determinante no processo de mielinização oligodendrocitário, dado que a sua inibição selectiva promove o aparecimento de bainhas de mielina maduras (com internodos e nodos de RANVIER) em culturas mistas de neurónios e oligodendrócitos (101). Aliás, a LINGO-1 pertence a um grupo emergente de proteínas transmembranárias tipo I, contendo motivos LRR e de adesão celular, presentes no encéfalo e implicadas na regulação do crescimento neuronal; este grupo inclui, também a AMIGO-1 (*Amphoterin-induced gene and ORF-1*) e a NGL-1 (*netrin-G1 ligand*) (102). A complexidade desta via de sinalização veio a ser ainda mais aumentada pelo facto de que o co-receptor p75 ser expresso apenas num número restrito de linhagens neuronais, e, inclusivamente, de estar ausente em células sensíveis aos ligandos NgR. Na procura de outros membros da família TNFR com homologia com o p75, um receptor órfão, até então de importância desconhecida, denominado TAJ/TROY/TNFRSF19 foi identificado como alternativa ao p75 no complexo de sinalização (103, 104). Existiriam, assim, dois tipos potenciais de complexos de receptores para a ansa Nogo-66, o NgR/p75^{NTR}/LINGO-1 e o NgR/TROY/LINGO-1. Não está, ainda, claro, se ambos são expressos concomitantemente, ou se têm padrões de expressão específicos, e se estão implicados nas mesmas, ou em diversas, funções.

A importância deste complexo sinalizador NgR/p75^{NTR}/TROY/LINGO-1, bem como um excelente exemplo de convergência funcional encontra-se no

facto de que, pouco tempo depois da identificação do receptor NgR, outro inibidor do recrescimento axonal, a já mencionada MAG, foi identificada como seu ligando (105, 106). Para além de interagir com o NgR, no entanto, a MAG pode, também, exercer as suas funções inibidoras após ligação aos gangliosídeos GD1a e GT1b (revisto em (93)). Paralelamente a esta descoberta, uma nova proteína *minor* da mielina ligada ao GPI, a glicoproteína oligodendrocitária da mielina, OMgp (até então um actor desconhecido nesta área), foi identificada como um inibidor da regeneração axonal, e, uma vez mais, como um ligando para o NgR (107). Ou seja, parece haver uma via final comum de sinalização para todos estes inibidores associados à mielina, e uma sobreposição funcional potencial entre estes. Deste facto resulta, uma vez mais, que qualquer estratégia de bloqueio dos inibidores presentes mielina deva contemplar a sua complexidade organizacional, e que abordagens dirigidas contra um deles, apenas, não deverão ter grande sucesso.

Como já acima referimos, a presença da sequência Nogo-66 em animais com capacidade de regeneração pode ser apontada como indicativa da existência de outras funções potenciais desta proteína. Igualmente a favor desta visão, tem-se tornado aparente que a Nogo-A interage com um conjunto mais alargado de proteínas, para além do seu receptor específico. Entre elas encontram-se proteínas mitocondriais como a NIMP (*Nogo-interacting mitochondrial protein*) e as proteínas do complexo III UQCRC1 e 2 (108), as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (109), proteínas do RER como a ASYIP/RTN3 (110), proteínas neuronais e oligodendrocitárias como a Caspr e a proteína básica de mielina, MBP (111, 112), e componentes do citoesqueleto como a α -tubulina (112) (revisto em (113)). Se a interacção com todas estas proteínas tem alguma relevância fisiológica é, ainda, incerto; como adiante veremos, no entanto, os modelos *knockout* desta proteína evidenciaram uma notável ausência de alterações fenotípicas, pelo que ou estas funções potenciais são pouco relevantes, ou existem outras proteínas capazes de suprir a falta da proteína Nogo.

Durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, a Nogo-A é expressa por diversas populações neuronais e poderá, mesmo, ter um papel na promoção do crescimento axonal, e na formação das vias nervosas (114-116)). Nas fases precoces da mielinização, e ao longo da organização das bainhas de mielina, a Nogo-A parece ter um papel relevante na formação do complexo axoglial na região paranodal, através da sua interacção com as proteínas Caspr-F3 (111). O complexo Caspr-F3 é responsável pela arquitectura do aparelho axolemna-glia, e a interacção da Nogo-66 com este complexo está relacionada com a disposição local dos canais iónicos de potássio. De facto, o complexo Nogo-A-Caspr interage directamente com os canais Kv1.1 e Kv1.2 e determina a sua segregação para a região juxtaparanodal (111). Ao longo do desenvolvimento e durante o processo de mielinização, os padrões espaciais e temporais de expressão destas proteínas coincidem, dando credito ao conceito de que a Nogo-A possui, nesta fase do desenvolvimento, funções não relacionadas com a inibição do recrescimento axonal. Mais ainda, em ratinhos mutantes *shiverer* (mutantes para a MBP) e na EAE do rato, assiste-se a uma desorganização anatómica do complexo juncional axoglial, bem como a uma realocização dos canais de potássio para a região paranodal, com implicações para a transmissão nervosa e, potencialmente, com implicações nas manifestações clínicas destas doenças (111). Igualmente de acordo com esta perspectiva, nos modelos experimentais de leucomalácia periventricular neonatal, a isquémia crónica presente nas regiões da substância branca profunda leva a uma redução da expressão da Nogo-A, bem como a uma desorganização da arquitectura neuronal com *sprouting* axonal aberrante (117).

No SNC adulto, as funções evidentes da Nogo-A prendem-se, de facto, com a manutenção do *status* anti-regenerativo deste órgão, o que se reflecte um pouco no seu padrão de expressão. A proteína Nogo-A está presente predominantemente nos corpos celulares dos oligodendrócitos e nas bainhas de mielina, e em pequenas quantidades em algumas populações neuronais no encéfalo e medula espinhal, sobretudo na maioria dos núcleos do tronco cerebral, nas células sensoriais dos gânglios raquidianos dorsais, e nos

neurónios motores e interneurónios medulares (118). Uma vez mais, a expressão de Nogo-A por neurónios adultos implica a existência de outras funções fisiológicas para esta proteína, como, por exemplo, sinalização atractiva ou repulsiva para outros neurónios, transdução de sinal para um ligando ainda por identificar, ou outras funções intracelulares (119). Recentemente, a expressão neuronal de Nogo-A foi identificada como quase universal, se bem que em graus diferentes; inversamente, a expressão do NgR é muito restrita, e ausente em populações neuronais que conseguem manter uma elevada capacidade regenerativa, como nos neurónios monoaminérgicos da *substantia nigra*, *locus coeruleus*, área ventral do tegmento, e núcleos da rafe mediana (120). Ou seja, a regulação da inibição mediada pela Nogo-A é feita pelo padrão de expressão do seu receptor. Com o envelhecimento parece existir uma diminuição progressiva da expressão do ARN mensageiro da Nogo-A, sobretudo na região do hipocampo, o que poderá estar relacionado com as alterações da plasticidade cortical com a idade, com implicações possíveis para as funções cognitivas associadas ao lobo temporal (121). Ao contrário do que poderia ser esperado para uma proteína com as suas características funcionais, o padrão de expressão da Nogo-A não é inequivocamente influenciado pela ocorrência de lesões no SNC. De facto, pelo menos num estudo, os níveis de Nogo-A/B não se modificam com o trauma encefálico ou medular (119); noutros trabalhos, os níveis de expressão de Nogo-A aumentaram na periferia das lesões medulares e do nervo óptico (122), enquanto que outros autores não só não confirmaram este aumento, como ainda descreveram uma diminuição no epicentro das lesões medulares (123). Por outro lado, a presença de neurotrofinas como a BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), ou de mediadores inflamatórios como a interleucina 1 β ou o TNF também não influi na expressão neuronal de Nogo-A (124). Em resumo, em circunstâncias fisiológicas, o papel da Nogo-A como modulador do crescimento neurítico parece estar limitado ao SNC em desenvolvimento, e posteriormente à inibição tónica do crescimento em populações neuronais adultas. Em circunstâncias patológicas da vida adulta, como no trauma do

SNC ou na Esclerose Múltipla, esta proteína poderá estender a sua acção à supressão da regeneração axonal, com consequências negativas para o prognóstico destas patologias.

Tendo em conta este papel proeminente atribuído à proteína Nogo-A na regulação da citoarquitECTURA do SNC, durante o desenvolvimento e na vida adulta, seria de esperar que a geração de modelos *knockout* em ratinhos resultasse em fenótipos neurológicos severos, ou que, pelo menos, modificasse, drasticamente, a capacidade regenerativa pós-lesional. No entanto, tal não foi o caso, e quando, em 2003, três grupos independentes publicaram, simultaneamente, dados provenientes dos seus modelos *knockout* gerados por diferentes processos, os resultados foram, em grande parte, contraditórios e decepcionantes – o editorial acompanhante destas publicações intitulava-se “No Nogo: now where to go?”^f (125). A disrupção do gene *nogo* foi feita, alternativamente, por mutação com inserção de uma armadilha génica retroviral (*retroviral gene trap*), resultando na ausência das isoformas Nogo-A e B (126); disrupção localizada do exão 3 do gene *nogo*, afectando apenas a Nogo-A (127); disrupção do locus *nogo* geradora de dois tipos de mutantes: nulos para a Nogo-A e B (deleção de toda a região codificadora do exão 1), ou nulos para a Nogo-C e nulos ou hipomorfos graves para a Nogo-A e B (substituição do exão 4 por um gene de resistência à neomicina) (128). Como referimos, todos estes diferentes mutantes tinham um fenótipo neurológico normal, com desenvolvimento e padrões comportamentais aparentemente inalterados. No que respeita à sua capacidade regenerativa após trauma medular, no entanto, os resultados foram diversos, desde melhoria clínica e regeneração evidente (126), até à ausência de qualquer benefício da mutação (128). Mesmo tendo em conta os diferentes tipos de *knockout* gerados, bem como as diferenças nos protocolos de geração e avaliação do modelo de trauma medular (uma fonte constante de dificuldades na comparação entre estudos nesta área), torna-se difícil

^f N.A. A escolha do nome Nogo para esta proteína tem dado azo a numerosos *double entendres* na literatura publicada. O próprio autor desta tese poderá ser julgado culpado desse facto pelo menos numa circunstância: “The growing roles of Nogo – I go, you go, we all go for Nogo” (Fontoura P, Steinman L. *J Neurol Sci* 2006; 245: 201-210).

conciliar estes resultados com as expectativas. Com a identificação de outros ligandos para o receptor NgR, como a MAG e a OMgp, poderia ser possível explicar estes resultados com base na redundância funcional existente no sistema de sinalização para os inibidores mielínicos. Como tal, a deleção do próprio gene *ngr* deveria resultar na perda da capacidade inibitória destas três proteínas, com efeitos mais significativos. Uma vez mais, dois grupos independentes geraram modelos *knockout* para este gene (129, 130); embora, neste caso, os resultados não fossem contraditórios, a magnitude dos efeitos observados ficou aquém do esperado. Num destes modelos, os ratinhos *ngr*^{-/-} demonstraram regeneração selectiva de vias longas provenientes do tronco cerebral (rafe-espinhal e rubro-espinhal), mas não da via cortico-espinhal; esta regeneração resultou em melhorias funcionais significativas (129); estes animais evidenciaram, também, alterações comportamentais discretas, tais como hipoactividade nos testes em campo aberto (129). No outro caso, a deleção do gene *ngr* não resultou numa redução significativa da capacidade inibitória da mielina *in vitro*, e, uma vez mais, os axónios cortico-espinhais não demonstraram aumento da sua capacidade de regeneração (130). No mesmo trabalho, a deleção do gene do co-receptor p75^{NTR}, apesar de ter mais efeitos *in vitro*, também não influenciou a regeneração da via cortico-espinhal (130); estes resultados foram também confirmados por outros autores independentes no modelo de trauma medular (131).

No seu conjunto, os dados provenientes destes dois tipos de mutantes parecem ser dificilmente conciliáveis com a importância dada aos inibidores mielínicos, e, sobretudo, com os resultados clínicos obtidos através de várias estratégias terapêuticas (incluindo, entre outras que adiante discutiremos, a utilização do anticorpo IN-1) de bloqueio da interacção Nogo-NgR. Os modelos *knockout* parecem confirmar a relevância do complexo de sinalização NgR para a regeneração de, pelo menos, alguns tipos de vias nervosas; parecem, igualmente, revelar que a Nogo-A poderá não ter um papel tão central dentro dos mecanismos de inibição da regeneração na vida adulta. Por outro lado – e como tivemos oportunidade de acima referir –, a complexidade do sistema Nogo-NgR tem vindo a aumentar

progressivamente: novas moléculas importantes para este sistema têm vindo a ser descobertas, quer novos ligandos, quer novos co-receptores associados. É possível que, em anos vindouros, seja possível explicar a disparidade de resultados obtidos até agora com base na identificação destes novos componentes. Por outro lado, é igualmente possível que a capacidade inibitória destas proteínas *in vitro* não corresponda aos seus efeitos *in vivo*; nas vias longas mielinizadas, estas moléculas poderão ter papéis de direccionamento, confinando a regeneração axonal às trajectórias pretendidas (132). Somente com o aumento da nossa compreensão das funções, e dos papéis fisiológicos normais destas proteínas inibidoras presentes na mielina, no SNC em desenvolvimento e no adulto, poderemos futuramente chegar a conclusões mais definitivas.

Como foi acima referido, as proteínas RTN parecem ter grande diversidade de funções biológicas, de acordo com a sua conservação filogenética e com a sua associação a várias outras proteínas intracelulares; estas funções poderão incluir vários passos do processamento proteico ao longo do RER e do aparelho de GOLGI, associação e modulação do processo apoptótico, fisiologia mitocondrial, e divisão celular (revisto em (113)). Assim sendo, a capacidade de inibição do recrescimento neurítico poderá ser, apenas, uma adaptação funcional de uma proteína com múltiplas outras funções, até ao momento desconhecidas ou inaparentes. A normalidade do fenótipo dos vários modelos *knockout* para este gene leva, também, à conclusão de que as suas funções não lhe são exclusivas, mas que existe, provavelmente, uma sobreposição de funções entre as proteínas RTN.

Apesar de, inicialmente, a atenção dos investigadores ter sido concentrada nos papéis da proteína Nogo como modulador do recrescimento e orientador axonal, com óbvias implicações para o campo da regeneração neuronal após trauma do SNC (particularmente no que respeita ao trauma medular), tornou-se gradualmente aparente que a multiplicidade de funções potenciais desta proteína poderia ter implicações para outras patologias neurológicas. Tivemos, recentemente, a oportunidade de fazer um trabalho de revisão acerca destes novos papéis da Nogo, para o qual referenciamos o

leitor, e do qual iremos fazer um breve resumo mais adiante (133). A grande maioria dos trabalhos publicados, no entanto, refere-se aos modelos de trauma do SNC, nomeadamente de trauma medular, e às tentativas de promoção da regeneração axonal nestas condições.

A regeneração pós-traumática das lesões da medula espinhal é um problema clínico da maior importância, e, até agora, sem solução satisfatória. O trauma medular tem consequências funcionais graves, gera incapacidade neurológica considerável, e está associado a co-morbilidade importante, bem como ao aumento de taxa de mortalidade (134, 135). Tal como a EM, esta patologia afecta, sobretudo, adultos jovens, levando à perda de autonomia e a estados de grande dependência física, emocional e social. Dos tratamentos existentes actualmente, apenas a utilização de corticoesteróides em dosagem elevada, durante a fase aguda, parece estar associada a alguma melhoria do prognóstico funcional em alguns doentes, embora mais recentemente mesmo a eficácia desta terapia tenha vindo a ser posta em causa (136-138). Nenhuma outra forma de terapia, quer na fase aguda como neuroprotecção, quer na fase crónica para a promoção da regeneração, tem tido qualquer eficácia confirmável, restando, somente, os tratamentos sintomáticos e a reabilitação fisiátrica. Dada a relevância clínica do problema, continua a haver grande interesse no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas nesta patologia (134, 135).

Como ficou dito no início deste ponto, o problema da regeneração axonal é complexo, e o desenvolvimento de qualquer estratégia terapêutica bem-sucedida está dependente da superação de vários obstáculos. Não parece existir, apesar de tudo, ausência de capacidade regenerativa nos neurónios adultos do SNC, como ficou demonstrado por DAVID e AGUAYO que conseguiram induzir crescimento de neurites em enxertos de nervo periférico transplantado para locais de trauma medular (139). Dentro das estratégias terapêuticas tentadas, a neutralização dos inibidores mielínicos tem sido estudada intensivamente, na tentativa de promover a regeneração axonal (revisto em (140)). Neste contexto, ao longo dos anos a proteína Nogo-A e seu receptor têm sido alvo de várias abordagens destinadas bloquear a

sua função, *in vitro* e, também, *in vivo*, nos modelos experimentais de trauma medular, encefálico e do nervo óptico (revistas exaustivamente em (141, 142)). Estas abordagens têm incluído, para além da geração dos modelos *knockout* acima referidos, a utilização de anticorpos bloqueadores (mAb IN-1) (143-146) de um péptido antagonista baseado na sequência Nogo-66 (NEP1-40)(147), e de formas truncadas solúveis do NgR (148). De uma forma geral, estes trabalhos têm reportado benefícios terapêuticos importantes, como sejam a promoção da regeneração axonal da via cortico-espinhal após hemi-secção dorsal da medula (144), *sprouting* axonal compensador (146), e melhoria em vários testes comportamentais e de locomoção (142, 145), como, por exemplo na pontuação BBB (*Basso-Beattie-Bresnahan rating scale*), considerada, por muitos, como a escala-padrão para avaliação destes modelos experimentais (149). No entanto, nem todas as populações axonais parecem ser sensíveis ao bloqueio da Nogo-A; por exemplo, as vias sensitivas dorsais ascendentes parecem ser refractárias (150).

Para além da sua utilização em experiências com roedores, anticorpos anti-Nogo foram também já empregues em primatas; inicialmente no sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*, (151)), e, muito recentemente, em primatas adultos da espécie *Maccaca* (152). Nestes últimos, após a produção experimental de uma lesão cervical C7-C8 unilateral, foi utilizado um novo anticorpo anti-Nogo por via intratecal, e a recuperação da destreza manual avaliada ao longo do tempo, através de vários testes de motricidade fina derivados da *modified Brinkman board task*. Como se pode notar, nesta experiência não só a espécie, mas, também, o paradigma comportamental avaliado, é muito mais relevante para o problema do trauma medular no ser humano. Com a utilização dos anticorpos anti-Nogo, houve uma redução significativa do tempo de recuperação da destreza manual, bem como evidência histológica (por *tracing* anterógrado com amina-dextrano biotinilada a partir do córtex motor contralateral) de regeneração e *sprouting* axonal (152). Não houve qualquer evidência comportamental que sugerisse a ocorrência de regeneração aberrante, indutora, por exemplo, de

dor crónica (uma preocupação teórica relevante, dada a inespecificidade aparente da terapêutica). Ou seja, a neutralização da Nogo-A resulta num aumento da regeneração da via cortico-espinhal, relacionável com melhorias funcionais, quer em testes de locomoção e comportamento em campo aberto (roedores), bem como da motricidade fina dos membros superiores (primatas). Não deixa de ser intrigante como o bloqueio de apenas um dos factores contributivos para o *status* anti-regenerativo do SNC possa ter efeitos funcionais tão significativos. Será de esperar que a aplicação desta terapia ao ser humano seja feita no contexto de uma abordagem multi-terapêutica na qual também participem, entre outros, agentes destinados a reduzir o papel da cicatriz (*e.g.* condroitinases (153-155)), factores neurotróficos (*e.g.* NT-3, BDNF (156-158)), e células estaminais ou glia olfactiva (*OEG-olfactory ensheathing glia*) (159-162).

Para além da sua importância para a regeneração pós-traumática, no que respeita às restantes doenças neurológicas, as isoformas da proteína Nogo têm sido implicadas em processos fisiopatológicos relacionados com a modulação do crescimento axonal durante o desenvolvimento e na degeneração do SNC, na fisiologia vascular, na patologia muscular relacionada com a desnervação, nos fenómenos apoptóticos, e nos tumores do SNC (revisto em (133) e tabela 2). Há, também, exemplos da aplicação de bloqueadores do sistema Nogo na promoção da recuperação após lesão não-traumática do SNC (tabela 2).

A relevância da Nogo em doenças associadas à perda axonal por degeneração, ou à plasticidade neuronal, é imediatamente aparente. Estão nesta categoria a epilepsia, as demências, as lesões do neurodesenvolvimento e a esquizofrenia (tabela 2). Em relação à epilepsia, o desenvolvimento dos aferentes no hipocampo mamífero está intimamente associado à expressão da Nogo e do seu receptor (115, 116). Os neurónios piramidais embrionários do dia 16 (E16) do hipocampo exprimem ARNm de Nogo-A, bem como algumas células do *gyrus dentatus* e do córtex entorrinal. O NgR é expresso mais tardiamente, sobretudo a partir dos dias pós-natais 0 a 5 (P0 a P5), na área CA3, e na porção superior da camada granulosa.

Como tal, durante o período embrionário não há interacção entre a Nogo-66 e seu receptor, pelo que esta proteína deverá desempenhar outras funções. Na vida adulta, no entanto, após danos provocados no hipocampo, a Nogo-A é expressa por astrócitos reactivos na camada molecular do *gyrus dentatus*, e poderá interferir na migração astrogliar para a zona lesionada. A expressão do receptor NgR, no entanto, é diminuída nas células granulosas e do hilo nos 15 dias subsequentes à lesão. A transcrição da Nogo e do NgR poderá estar relacionada, também, com o nível de actividade neuronal; as células granulosas do hipocampo diminuem a expressão de ambos os genes após administração do agonista glutamatérgico kainato. Para além da sua participação no desenvolvimento do hipocampo e suas conexões, durante a formação das vias da substância branca cortical profunda, o sistema Nogo poderá estar implicado na orientação correcta dos axónios. Num modelo de leucomalácia periventricular por hipoxia crónica (dias P3 a P33), foi observada uma diminuição da expressão de Nogo-A, que poderia estar relacionada com aberrações no estabelecimento das vias de ligação (117). Por outro lado, noutro modelo de isquemia aguda neonatal (dia P7), houve um aumento da expressão de Nogo-A e NgR (163). A aparente contradição entre estes dois trabalhos poderá estar relacionada com a gravidade e cronicidade do estímulo lesivo: para estímulos agudos, o aumento de expressão destas proteínas impediria a ocorrência de reinervação aberrante (ou poderia desempenhar outras funções, *e.g.* promoção da apoptose), enquanto em lesões crónicas ou subagudas, a sua diminuição permitiria alguma tentativa de regeneração. De qualquer forma, estes resultados, parecem implicar a regulação da expressão deste inibidor mielínico em processos fisiopatológicos associados a regeneração aberrante do SNC. Outra situação semelhante ocorre durante a formação da esclerose mesial do hipocampo (EMH), provavelmente a principal causa de epilepsia focal sintomática. Nesta doença estão descritas várias alterações das vias de associação intrahipocámpicas, bem como atrofia, gliose e perda neuronal em determinadas áreas específicas deste córtex, associadas à geração de potenciais epileptogénicos (revisto em (164)). Como tal, o papel de um

inibidor do recrescimento axonal poderia ser determinante para o aparecimento de fenómenos de regeneração aberrante (*aberrant sprouting*). Quer em modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal, quer em amostras clínicas de doentes com epilepsia do lobo temporal submetidos a cirurgia terapêutica, foi demonstrado um aumento na expressão de Nogo-A, na maioria dos neurónios do hipocampo, em amostras com, e sem, EMH (165, 166). Nestas condições, o papel da Nogo-A no desenvolvimento da EMH não é claro: ou desempenha outras funções não relacionadas com o recrescimento axonal, ou então, a sua capacidade inibitória não é suficiente para impedir o aparecimento de regeneração aberrante, promovida por outros factores locais.

Estão descritas numerosas alterações neuropatológicas no encéfalo dos doentes com esquizofrenia, sendo, actualmente, aceite, que existem numerosas alterações do neurodesenvolvimento e da plasticidade neuronal, bem como aumentos na apoptose dos neurónios corticais, implicadas na patogénese desta doença (revisto em (167, 168)). Alterações da expressão das isoformas da proteína Nogo e do seu receptor poderiam ser importantes, como moduladores da orientação e crescimento axonal mas, também, pela sua participação na apoptose. Neste contexto, é interessante observar que aumentos na expressão da Nogo-A e Nogo-C têm sido descritos no córtex frontal destes doentes (169, 170). Estes aumentos foram associados, pelo menos em alguns casos, à existência de uma inserção CAA na região 3' não-traduzida (3'UTR) (169, 171), embora noutros trabalhos esta associação não foi confirmada (172, 173). Mutações no gene do receptor NgR foram já descritas em alguns doentes isolados, mas um estudo populacional não confirmou a sua existência (174, 175). Por último, no que respeita à neurodegeneração e demência, é interessante observar que aumentos da expressão da Nogo-A foram encontrados no hipocampo de doentes com demência de Alzheimer, em associação com placas de beta amiloide, e que o NgR interage com a proteína precursora do amiloide, impedindo o seu processamento pelas secretases em placa de beta amiloide (176, 177). Para além disso, a Nogo-A poderia participar nos processos de plasticidade

cortical associados ao envelhecimento e à demência (178). Torna-se relevante, como tal, relembrar que há uma diminuição desta proteína com o envelhecimento, o que poderá ter implicações para o aparecimento, ou para a resposta a estes processos neurodegenerativos (121).

A expressão de isoformas da Nogo em células de músculo liso e estriado tem-se mostrado relevante em dois tipos de situação. Por um lado, a expressão de Nogo-B em células de músculo liso e endotélio vascular parece estar relacionada com o processo de remodelação após danos vasculares (179). Os níveis de expressão elevados desta proteína, existentes normalmente, estão diminuídos após a ocorrência de danos vasculares, e a ausência de Nogo-A/B em ratinhos *knockout* provoca uma proliferação excessiva de neo-íntima, com consequente estenose completa dos vasos (179). Em condições fisiológicas, esta molécula parece ter funções quimioatractoras para as células endoteliais, promovendo a adesão entre as células endoteliais e células musculares lisas, e inibindo a migração destas últimas promovida pelo PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (179). A porção Nogo-66 desta isoforma inibe a migração dos miócitos através de um receptor ainda não identificado (mas que não é o NgR), enquanto que a porção amino da Nogo-B aumenta a migração das células endoteliais, interagindo com um receptor recentemente identificado, denominado NgRB (180). Em teoria, a identificação deste mecanismo implicado na neo-angiogénese e remodelação vascular poderá abrir possibilidades de manipulação terapêutica com implicações para as doenças cardio e cerebrovasculares. Noutro tipo de abordagem, anticorpos bloqueadores da Nogo (IN-1) foram já empregues em modelos experimentais de acidente vascular cerebral isquémico para a promoção da regeneração pós-lesional; os resultados têm sido largamente positivos, mesmo em animais mais idosos, e quando a terapêutica tarda até 1 semana depois de o dano ter ocorrido (181-184).

A expressão das isoformas da Nogo tem, também, sido estudada como marcador de desdiferenciação muscular após desnervação, no contexto das doenças do neurónio motor, servindo como marcador potencial para a

esclerose lateral amiotrófica (ELA). Inicialmente, em modelos de ELA mutantes transgênicos para a SOD1 (superóxido dismutase), bem como em doentes com ELA, foram encontrados aumentos da expressão da Nogo-A e diminuição da Nogo-C, concomitantemente com o início da doença (185). Uma vez que, em músculo embrionário, o ARNm da Nogo-A é abundante, estas alterações poderiam corresponder a uma desdiferenciação celular pós-desnervação, e a detecção de aumentos do ARNm de Nogo-A poderia servir como marcador diagnóstico da ELA (185, 186). Os níveis de expressão da Nogo-A parecem estar, também, relacionados com a severidade da progressão desta doença (187). A diminuição da Nogo-C não é específica da ELA, no entanto, podendo também ser observada em outras patologias com desnervação, como nas neuropatias; presumivelmente, esta supressão corresponde a uma tentativa de promover a regeneração muscular por supressão das suas propriedades inibitórias (185). Mais recentemente, foi relatado, em modelos animais de ELA, que o aumento da expressão da Nogo-A leva à retracção da placa motora pré-sináptica e atrofia pós-sináptica, com consequente agravamento do processo desnervativo por repulsão e morte axonal, e que na sua ausência há um aumento da sobrevivência das fibras musculares (188). Ou seja, a presença de Nogo-A nos miócitos poderá ser não somente um marcador diagnóstico para a ELA, mas, também, um participante activo no mecanismo fisiopatológico desta doença.

No que respeita à patogénese tumoral, a participação da proteína Nogo nos mecanismos de apoptose celular poderia ter implicações para a génese e progressão de vários tipos de cancro. No início, foi identificada uma nova proteína indutora da apoptose ASY, sem homologias conhecidas, como sendo a isoforma Nogo-B; a ASY/Nogo-B era capaz de induzir apoptose em várias linhas tumorais, supostamente por associação com proteínas do retículo endoplasmático (189). Para além disso, a proteína Nogo-B tem capacidade de ligação às proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL e Bcl-2, e poderia impedir as suas funções, apesar de não aumentar a susceptibilidade aos estímulos apoptóticos (109). Aumentos de expressão de outra isoforma da

Nogo, a Nogo-C, foram recentemente associados à indução de apoptose em linhas celulares embrionárias de rim (células HEK293) pela via de sinalização JNK-c-Jun (190). Vários estudos, com resultados parcialmente contraditórios, têm abordado o papel apoptótico da Nogo-B em tumores humanos. Saliente-se que estes estudos têm empregado diferentes métodos de indução de expressão da Nogo-B e de *stress* do retículo endoplasmático, o que poderá estar relacionado com a cinética de expressão desta proteína. Num trabalho, as células de tumor de pequenas células do pulmão não evidenciaram expressão de ASY, levando à suposição de que esta perda poderia ser um mecanismo etiopatogénico (189). Mais tarde, estes achados foram negados pela detecção de ASY/Nogo-B em vários tipos de cancro (cancro mamário, osteossarcoma, carcinoma do pulmão, neuroblastoma, etc.) sem que essas células tivessem maior susceptibilidade à apoptose (191). De igual modo, outros membros da família RTN, como a RTN1, têm aumentos de expressão nas células cancerígenas, pelo que a diminuição na Nogo-B poderá ser apenas um mecanismo compensador (191). Mais recentemente, a diminuição de expressão da ASY/Nogo-B foi associada à maior agressividade do linfoma de células T do adulto (192). No que respeita aos tumores de linhagem neuronal, num único estudo foi divulgado que linhas celulares de glioma humano exprimiam endogenamente o receptor NgR, e que a sua migração *in vitro*, e as suas capacidades invasoras, eram impedidas pela presença da MAG e da Nogo-66 (193). Se estes achados forem confirmados, por exemplo a partir de biopsias tumorais, poderá ser possível desenhar terapêuticas destinadas a aproveitar esta via de sinalização para impedir a progressão tumoral, por exemplo, através da indução da expressão dos inibidores mielínicos, ou a criação de ligandos específicos para o NgR. No seu conjunto, e apesar de serem ainda muito preliminares e parcialmente contraditórios, o sistema Nogo-NgR parece desempenhar um papel relevante na fisiopatologia tumoral, com potencial de desenvolvimento diagnóstico e terapêutico interessante (revisto em (194)).

Grupo patológico	Papel	Referência
Tumores	A expressão do gene ASY/Nogo-B induz apoptose em linhas celulares cancerígenas; supressão da expressão em tumor de pequenas células do pulmão.	(189)
	Interação da proteína Nogo-B com as proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL e Bcl-2.	(109)
	A expressão de Nogo-B não induz apoptose em linhas celulares de osteossarcoma.	(191)
	Nogo-66 e MAG, actuando através do NgR, inibem a capacidade migratória e a invasividade de linhas celulares de glioma in vitro.	(193)
	A diminuição da expressão do gene ASY/Nogo-B está associada ao aumento de agressividade do linfoma/leucemia de células T do adulto.	(192)
	Sobre-expressão da Nogo-C induz apoptose em linhas celulares embrionárias de rim HEK293.	(190)
Esquizofrenia	Aumento da expressão do ARNm no córtex frontal de doentes. Presença de uma inserção CAA homozigótica na 3'UTR do gene nogo.	(169)
	Ausência de inserção CAA na 3'UTR em doentes esquizofrénicos.	(172)
	Mutações do gene ngr em 3 doentes esquizofrénicos.	(174)
	Ausência de inserção CAA na 3'UTR em doentes esquizofrénicos.	(173)
	Ausência de inserção CAA na 3'UTR em doentes esquizofrénicos e bipolares.	(195)
	Associação dos polimorfismos CAA e TATC na 3'UTR em doentes esquizofrénicos femininos.	(171)
	Ausência de polimorfismos no gene ngr na população esquizofrénica chinesa.	(175)
	Aumento da Nogo-C, e discreto aumento da Nogo-A no córtex frontal de doentes esquizofrénicos; redução da Nogo-B em doentes deprimidos; correlação entre a presença de inserção CAA na 3'UTR e os níveis de Nogo-A/C.	(170)
Demência	Papel da Nogo na plasticidade cortical na doença de Alzheimer.	(178)
	Interação entre a proteína precursora do amiloide APP e o NgR levando ao bloqueio do processamento APP-A β pelas secretases.	(176)
	Aumento da expressão da Nogo-A no hipocampo em doentes de Alzheimer e associação às placas de A β .	(177)
Epilepsia	Aumento da expressão de Nogo-A após convulsões induzidas pelo kainato em ratinhos.	(165)
	Aumento da expressão de Nogo-A em amostras cirúrgicas de epilepsia do lobo temporal, com e sem esclerose mesial acompanhante.	(166)
Cerebrovasculares	Melhoria clínica funcional e aumento da regeneração contralateral num modelo experimental de AVC tratado com anticorpos anti-Nogo	(181)
	Melhoria funcional e aumento da regeneração contralateral em ratinhos NgR ^{-/-} , Nogo-A/B ^{-/-} , e com a administração de bloqueador do receptor NgR.	(182)
	Melhoria funcional e aumento da regeneração em ratos tratados com anticorpo IN-1 mesmo 1 semana após AVC isquémico.	(183)
	Melhoria funcional e aumento da regeneração em ratos idosos, mesmo 1 semana após AVC isquémico.	(184)
	Aumento da expressão de Nogo-A em oligodendrócitos, 2 meses após AVC isquémico experimental em <i>C. jaccus</i> .	(196)
Neuromusculares	Aumento da expressão da Nogo-A, e diminuição da Nogo-C, em modelos transgênicos e amostras de músculo de doença do neurónio motor (DNM).	(185)
	Aumento da expressão de Nogo-A, e diminuição da Nogo-C, em músculo desnervado.	(186)
	Correlação do aumento da Nogo-A com a severidade da doença do neurónio motor.	(187)
	A sobre-expressão de Nogo-A leva à retracção da placa motora pré-sináptica, e a sua deleção genética ao aumento de sobrevivência das fibras musculares num modelo animal de DNM.	(188)
Hipóxia-isquémia neonatal	Diminuição da expressão de Nogo-A num modelo de leucomalácia periventricular neonatal (Rodent chronic sublethal hypoxia (CSH) do dia P3 a 33).	(117)
	Aumento da expressão de Nogo-A e NgR num modelo de hipóxia-isquémia pós-natal (P7) aguda.	(163)

Tabela 2. Participação da proteína Nogo em diversas patologias neurológicas.

O nosso interesse pela resposta imune contra a proteína Nogo originou-se a partir de duas perspectivas diferentes. Por um lado, uma vez que entre as estratégias que tem vindo a ser desenvolvidas para bloquear a acção dos inibidores mielinicos, a imunização terapêutica tem-se mostrado relevante, pensámos que o estudo das características da resposta imune contra a proteína Nogo poderia ser importante. Por outro lado, uma vez que se estava presença de uma nova proteína da mielina, de importância ainda desconhecida no contexto das doenças desmielinizantes, considerámos que se deveria avaliar o seu papel quer como inibidor da regeneração axonal, quer como potencial autoantigénio.

Existem muito poucos trabalhos publicados sobre o papel da Nogo-A na Esclerose Múltipla. Como acima referimos, a expressão *in vitro* de Nogo-A em neurónios e oligodendrócitos não é alterada pela presença de neurotrofinas como o BDNF ou o GDNF (*Glia-derived neurotrophic factor*), nem pelas citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β ou TNF, que estão presentes nas lesões inflamatórias agudas do SNC (197). Por outro lado, foi possível detectar por imunohistoquímica, em cérebros de doentes com EM, um aumento de expressão de Nogo-A nos oligodendrócitos na periferia de lesões crónicas activas, bem como do receptor NgR em astrócitos reactivos e microglia presentes nestas lesões (124). A presença do NgR nestas células com papel importante na reacção inflamatória local no SNC, tem significado fisiológico ainda desconhecido, mas que poderá incluir algum tipo de modulação da resposta imune (124). No único estudo, realizado até hoje, sobre a presença de reactividade imune contra a proteína Nogo em doentes, REINDL *et al.* detectaram níveis significativos de IgM sérica, e IgG intratecal, em doentes com EM e outras doenças agudas do SNC, de natureza inflamatória ou outra (198). Estes anticorpos poderiam ter um de três papéis: ou estarem implicados na patogénese da doença, ou serem um epifenómeno irrelevante das lesões da substância branca, ou, por fim, terem capacidade promotora da regeneração axonal. Infelizmente, a presença destes anticorpos não foi, ainda, confirmada por mais nenhum trabalho, e a presença de respostas linfocitárias T contra a proteína Nogo não foi ainda

pesquisada em doentes com EM. À semelhança do que sucede com outras proteínas da mielina do SNC, a presença de reactividade imune contra a Nogo poderia ter relevância do ponto de vista etiopatogénico, mas também para o desenvolvimento de terapias imunomoduladoras, ou de promoção da regeneração. Iniciámos, recentemente, um estudo destinado a responder a esta questão que, à data de escrita deste trabalho, está a ser desenvolvido no Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, e cujos resultados aguardamos. Por último, muito recentemente foi publicado um trabalho que sugere que a presença de proteína Nogo-A solúvel no LCR serve como um biomarcador diagnóstico específico da EM, em comparação com outras doenças neurológicas inflamatórias, infecciosas ou autoimunes (199). Aguarda-se a confirmação destes resultados, que poderiam ter grande relevância para o diagnóstico diferencial destas patologias.

O conceito de utilização terapêutica da resposta imune contra antígenos do próprio, pertencentes ao SNC (denominada de autoimunidade neuroprotectora), tem sido alvo de numerosos trabalhos em anos recentes, com resultados positivos em vários modelos experimentais (revisto em (200)). No que respeita ao problema da regeneração axonal pós-traumática, as primeiras experiências a demonstrar efeitos benéficos, realizadas por HUANG *et al.*, utilizaram vacinação com homogeneizado de medula espinhal em adjuvante incompleto de FREUND (*i.e.* sem adição de Micobactérias), em ratinhos Balb/c (201). Esta abordagem resultou na produção de anticorpos policlonais que, presumivelmente, bloquearam a acção de vários – então desconhecidos – inibidores presentes na mielina, com melhorias funcionais resultantes, e com promoção da regeneração axonal *in vivo* e *in vitro* (201).

Com a identificação da proteína Nogo, e dos seus domínios inibidores, o alvo da resposta imune pode ser mais bem definido; logo após a identificação do domínio NiG, HAUBEN *et al.*, vacinaram ratos Lewis e Sprague-Dawley com um péptido sintético derivado da região N-terminal (p472, Nogo623-640) em adjuvante completo de FREUND, com indução de uma forte resposta celular T, mas não de anticorpos (202). A transferência

adoptiva destas linhas celulares T para animais com contusões medulares incompletas resultou numa melhoria funcional da sua recuperação, sem, aparentemente, consequências deletérias. Note-se, no entanto, que o fenótipo imune destas células não foi descrito pelos autores, pelo que a ausência de sinais de encefalitogenicidade – mesmo na estirpe Lewis, susceptível à EAE – não pode ser definitivamente provada. Os próprios autores salientam que não podiam excluir a existência de lesões desmielinizantes subclínicas, provocadas por linfócitos T infiltrantes (202). A mesma técnica de transferência adoptiva resultou numa redução da perda de células do gânglio retiniano após esmagamento do nervo óptico, o que poderá ser considerada evidência de neuroprotecção induzida pela imunização com o péptido Nogo. Noutra abordagem, MERKLER *et al.*, testaram a imunização intra-esplénica com uma proteína de fusão contendo a região específica da Nogo-A (NiG, Nogo174-979) e o fragmento C do tifoide tetânico (TTC), para a indução de anticorpos anti-Nogo na ausência de resposta T (203). A intenção dos autores, com esta escolha de proteína recombinante de fusão, foi, precisamente, evitar a indução de uma resposta autoimune potencialmente deletéria contra a mielina. Como pretendido, a estratégia de vacinação utilizada resultou somente numa forte resposta linfocitária B, com *switching* isotípico de IgM para IgG mediado por linfócitos T específicos para o fragmento do TTC. Não foi detectada qualquer resposta T contra o fragmento Nogo, nem a vacinação induziu EAE (203). No seguimento do trabalho inicial, acima comentado, de HUANG *et al.*, a imunização contra a ansa extracelular Nogo-66 foi testada por SICOTTE *et al.*; estes autores compararam a vacinação com mielina total contra uma mistura das proteínas recombinantes MAG e Nogo-66, emulsificadas em adjuvante incompleto ou alum (hidróxido de alumínio), em ratinhos SJL/J, e demonstraram aumento da regeneração da via cortico-espinhal e *sprouting* axonal (204). Embora tenha sido utilizada uma estirpe de ratinho susceptível à EAE, não foram observados sinais clínicos ou histológicos de desmielinização. Este facto não é, talvez, surpreendente, tendo em conta a escolha de adjuvante; como tivemos oportunidade de rever em pormenor no

Capítulo II, foi precisamente a utilização do adjuvante completo que possibilitou a obtenção, consistentemente, do modelo de EAE. Nenhum dos adjuvantes utilizados por estes autores tem a capacidade de induzir uma resposta celular Th1 com características encefalitogénicas, mas sim predominantemente uma resposta Th2. Saliente-se, ainda, que a indução de anticorpos anti-mielina (conseguida nestes dois últimos trabalhos) não é suficiente por si só, em nenhum modelo experimental de desmielinização, para induzir sinais de doença, e que é sempre necessária a existência de uma resposta T acompanhante.

Por último, à semelhança do que pretendemos fazer com o desenvolvimento de vacinas de ADN anti-Nogo (como descrito no final do Capítulo V), XU *et al.*, publicaram os resultados obtidos com uma vacina de ADN codificadora de múltiplos domínios inibidores presentes na mielina: sequência Ig1-5 da MAG, domínio EGF-L da Tenascina-R, e domínios Nogo-66 e Amino-Nogo (205). Esta vacina, utilizada em ratos Lewis, induziu a produção de anticorpos contra todos os domínios inibidores codificados, com capacidade bloqueadora *in vitro*. nenhuns sinais de EAE clínica ou histológica foram detectados, e os autores conseguiram demonstrar efeitos benéficos sobre duas medidas de recuperação funcional (pontuação BBB e extensão do passo), bem como na avaliação histológica de regeneração por *tracing* (205). Os nossos próprios resultados, obtidos após vacinação com ADNc codificador das sequências p472 (tal como HAUBEN *et al.*), Nogo-66 e NgR, num modelo de contusão medular em ratinhos C57BL/6, são indicativos da presença de algum tipo de efeito neuroprotector da vacinação com ADN, mais do que da promoção de regeneração. Apesar de não os apresentarmos nesta tese, basta dizer que o benefício da vacinação com ADN foi observável mesmo uma semana após o trauma, pouco tempo para que se pudesse dar qualquer tipo de fenómeno de neuroplasticidade; por outro lado, mesmo os ratinhos vacinados com vector vazio evidenciaram melhorias funcionais. Encontra-se, ainda, em desenvolvimento em

colaboração com o Centro Reeve-Irvine^f, um projecto para avaliar os mecanismos deste efeito terapêutico.

Em resumo, todos os ensaios publicados de imunização utilizando regiões inibidoras da Nogo-A foram desenhados, quase exclusivamente, com o intuito de não provocar uma reacção autoimune, pelo que a ausência de encefalitogenicidade desta proteína não está provada. No nosso caso, ao invés, procurámos juntar as condições apropriadas para que essa reacção se pudesse dar, através de um protocolo de quebra de tolerância: imunização repetida com péptidos Nogo em doses elevadas, utilização de adjuvante completo de FREUND e de *pertussis*. Como tivemos oportunidade de demonstrar (133, 206), Capítulo V), nessas condições é possível induzir uma resposta autoimune contra vários epítomos presentes na ansa Nogo-66 e, em algumas circunstâncias, induzir sinais clínicos e histológicos de EAE.

Para além do nosso trabalho, outro grupo independente publicou, recentemente, resultados respeitantes ao papel da Nogo-A na EAE. Tal como nas nossas experiências, KARNEZIS *et al.*, estudaram a indução de EAE em ratinhos *knockout* para a Nogo-A/B, obtendo resultados idênticos: a ausência da proteína Nogo levou a uma melhoria do fenótipo clínico da EAE (207). Em algumas experiências, foi detectada uma redução da proliferação contra o antigénio indutor MOG35-55, bem como uma redução na produção de IFN γ por linfócitos T anti-MOG (207). A avaliação histopatológica destes animais mostrou, igualmente, uma redução na extensão e severidade das lesões desmielinizantes e da perda axonal (207). No nosso caso, tal como mostrámos no Capítulo V (Figuras 1-7), não foi possível detectar alterações consistentes no que diz respeito a qualquer destes critérios. Pelo contrário, pelo menos numa ocasião, a deleção do gene *nogo* resultou num aumento da proliferação anti-MOG e da produção de IFN γ (Cap. V, Figura 4A e B). Por outro lado, quando utilizámos outro modelo diferente de *knockout*, no qual estava preservado o C-terminal, não fomos capazes de observar diferenças significativas, clínicas ou *in vitro* (Cap. V, Figuras 5-7). Do ponto de vista

^f Deixamos, aqui, os nossos agradecimentos por toda a colaboração da *University of California at Irvine*, nomeadamente a dos Profs. Oswald Steward, Aileen Anderson e Hans Keirstead, que estiveram envolvidos neste projecto.

histológico, não encontramos, também, quaisquer diferenças significativas no perfil patológico da EAE neste modelo; quer em relação às colorações clássicas de avaliação de inflamação e lesão axonal, quer na quantificação no número e localização das lesões (Cap. V, Figuras 2, 3, 7). No seu conjunto, interpretámos estes resultados como indiciando um papel imunomodulador para a ansa Nogo-66, e como evidência da sua participação no processo autoimune contra a mielina. Estes resultados são, aparentemente, difíceis de conciliar com os de KARNEZIS *et al.*, e não nos parece claro qual será o mecanismo subjacente à melhoria clínica observada nos ratinhos *nogo*^{-/-}, apenas que esta parece ser reprodutível entre grupos experimentais, o que, em si, é indicativo da relevância desta proteína na fisiopatologia da desmielinização.

No restante do seu trabalho, KARNEZIS *et al.*, concentraram os seus esforços na sequência Nogo623-640 (correspondente ao péptido p472 derivado da região Amino-Nogo), cujo interesse potencial já foi acima mencionado. Utilizando ratinhos C57BL/6, e um protocolo de indução de EAE por imunização do péptido Nogo623-640 (500 µg) emulsificado em adjuvante completo e administração de *pertussis*, estes autores não observaram sinais clínicos ou histológicos de doença. A avaliação da resposta proliferativa contra este antígeno, feita em esplenócitos, revelou fraca reactividade (índices de estimulação entre 0.9-1.4). Nas nossas experiências, a sequência Nogo623-640 não despertou respostas linfocitárias T consistentes, em qualquer das estirpes estudadas, incluindo a C57BL/6 (Cap. V, Figura 20); apenas numa situação foi possível demonstrar reactividade T contra a Nogo623-640 na estirpe C57BL/6, igualmente com índices de proliferação baixos. A ausência de reactividade T significativa contra a Nogo623-640 explica, em grande medida, a ausência de encefalitogenicidade, uma vez que, como já amplamente discutimos (Capítulo I e II), a EAE é uma patologia mediada por este tipo de resposta imune adaptativa.

No seguimento desta tentativa, KARNEZIS *et al.*, imunizaram ratinhos com Nogo623-640 em adjuvante incompleto de FREUND, sendo

EAE induzida pelo protocolo padrão com MOG35-55 e *pertussis*. Neste caso, observou-se uma melhoria clínica e histológica significativa do curso da doença, acompanhada de um enviesamento Th2 (diminuição da produção de IFN γ , aumento da produção de TGF β e IL-10) da resposta linfocitária contra a MOG (207). Não foi encontrada evidência de reactividade cruzada entre a MOG e a Nogo623-640 nesta situação, embora tenha apenas sido testada em esplenócitos totais, e não em linhas celulares, como no nosso caso. Não foi, igualmente, avaliada a presença de diversificação de epítomos para incluir a Nogo623-640, ao longo do curso da doença. Por último, foram detectados anticorpos anti-Nogo623-640 nos animais imunizados com este péptido em adjuvante incompleto, os quais demonstraram capacidade bloqueadora de inibidores mielínicos *in vitro*; a imunização passiva com anticorpos policlonais IgG anti-Nogo623-640, purificados por afinidade, em ratinhos induzidos com MOG-EAE, foi capaz de prevenir a incidência da doença (207). A este respeito, os nossos próprios dados (não mostrados neste trabalho) não confirmam a existência de diversificação significativa a partir do determinante Nogo623-640 na estirpe S/JL/J. Após imunização com este péptido, o estudo da resposta linfocitária B, utilizando *spotted microarrays*, revelou a presença de forte reactividade contra o antígeno imunizador, bem como fraca reactividade contra outros determinantes da mielina (MBP13-21, Golli MBP100-114, MOG14-39, CNPase374-388), mas sem a consistência ou dimensão observada após imunização com os outros antígenos Nogo.

No seu conjunto, o trabalho de KARNEZIS *et al.*, confirma a importância da proteína Nogo-A para a etiopatogénese da EAE. A deleção genética da proteína, a imunização activa contra o epítipo Nogo623-640, ou a imunização humoral passiva contra este mesmo determinante, resultam numa melhoria clínica e histológica do fenótipo deste modelo de EAE crónica. Este efeito protector parece, por um lado, basear-se numa alteração do fenótipo dos linfócitos anti-MOG para Th2, por um mecanismo até agora desconhecido. De igual forma, o aparecimento de anticorpos anti-Nogo poderá promover uma melhoria do microambiente local que leve à regeneração axonal. Não foi demonstrado, no entanto, qualquer efeito

regenerador *in vivo*, e o perfil de melhoria clínica após imunização activa ou passiva é condizente com um efeito imunomodulador destes anticorpos.

Como tivemos a oportunidade de demonstrar no Capítulo V, os nossos esforços foram concentrados no estudo da resposta imune contra antígenos potenciais na região Nogo-66 (Nogo1024-1090 humana), bem como na sua importância como autoantígeno no modelo de EAE. A análise da estrutura primária desta região (Cap. V, Figuras 8-13), bem como a modelação de ligação às moléculas MHC de classe I e II (Cap V., Figuras 14 e 15A), levaram-nos a crer na existência de múltiplos determinantes potenciais; após esta análise, foram sintetizados péptidos (Nogo1-22, Nogo23-44, Nogo45-66) para abarcar toda esta região, e, de seguida, estes péptidos foram utilizados para o estudo das respostas linfocitárias T e B após imunização, e para a indução de EAE em estirpes de ratinho susceptíveis. Constatámos que, nas estirpes SJL/J e C57BL/6, foi possível observar sinais clínicos e histológicos de EAE numa pequena percentagem de animais testados, após utilização de um protocolo de quebra de tolerância, sobretudo para o péptido Nogo45-66 (Cap. V, Figura 16A-D). Ao invés dos restantes investigadores que têm publicado resultados respeitantes à resposta imune contra esta região, no nosso caso procurámos, activamente, e tivemos sucesso na indução de EAE. Como tal, não podemos assumir que a imunoterapia contra a região Nogo-66 seja, sempre, inteiramente segura. Não deixa de ser verdade, no entanto, que só em condições especiais de imunização (e, mesmo nesse caso, numa percentagem reduzida de casos) nos foi possível quebrar tolerância contra este antígeno. Parece confirmar-se, portanto, que as estratégias de imunização utilizando adjuvantes menos imunogénicos são, provavelmente, seguras.

Após imunização, foram detectadas respostas linfocitárias T proliferativas contra os antígenos Nogo1-22 e Nogo45-66 na estirpe SJL/J, e Nogo1-22 e Nogo23-44 na estirpe C57BL/6 (Cap. V, Figura 18 e 19); posteriormente a estas experiências, testámos várias estirpes de ratinho susceptíveis a doença autoimune, utilizando estes mesmos péptido, bem como outros de sequência sobreposta. Os resultados revelaram a presença de

baixos níveis de reactividade, em todas as estirpes, contra pelo menos um destes péptidos (Cap. V, Figura 20). Assim sendo, a região Nogo-66 parece ser altamente imunogénica, possuindo múltiplos epítomos potenciais. No nosso mapeamento, ainda provisório, dos epítomos nesta região, os determinantes antigénicos mínimos parecem ser as sequências Nogo7-16 e Nogo49-59 para a estirpe SJJ/J, e Nogo3-12 para a C57BL/6 (Cap. V, Figura 44). Como referimos, achamos importante que, em investigações futuras, seja confirmado este mapeamento provisório e que sejam determinados os resíduos-chave para o contacto com o MHC e o TCR, para estas duas estirpes; no seguimento deste trabalho, deveriam ser feitos, igualmente, mapeamentos dos epítomos para as outras estirpes que demonstraram, nos nossos resultados, possuir reactividade linfocitária T. Por último, deverão ser feitas experiências de indução de doença, pelo menos nas estirpes susceptíveis à EAE, com base nos determinantes antigénicos assim revelados. É possível que a relativa dificuldade de indução de sinais clínicos de EAE, apesar da forte resposta linfocitária T e B, seja superável pela utilização de sequências antigénicas melhor definidas.

Utilizando linhas celulares mantidas *in vitro* durante longo termo, bem como ensaios de proliferação e ELISPOT, não nos foi possível encontrar qualquer evidência de reactividade cruzada com outros antigénios de mielina, nem de diversificação de epítomos da resposta T (Cap. V, Figuras 30A-B). Em comparação com linhas celulares anti-PLP139-151, não encontrámos, igualmente, diferenças muito significativas de repertório V β , confirmando a ausência de restrição na estirpe SJJ/J contra estes antigénios (Cap. V, Figura 35). No que respeita ao fenótipo da resposta T, observámos, predominantemente, o aparecimento de fenótipos Th1, embora *in vitro* fosse possível diferenciar linhas celulares Th2 contra a Nogo45-66 (Cap. V, Figuras 21-22). Avaliámos, através de citometria de fluxo, a evolução de marcadores de activação, co-estimulação e memória, após imunização activa com os péptidos Nogo, bem como em linhas celulares mantidas *in vitro* (Cap. V, Figuras 31 a 34); em relação a todos os marcadores utilizados, não foram

perceptíveis diferenças significativas, por comparação com a imunização com o antígeno PLP139-151.

Foram feitas várias tentativas de transferência adoptiva de doença, utilizando linhas celulares diferenciadas, sem sucesso, apesar da confirmação da viabilidade destas células, no animal receptor, após injeção (Cap. V, Figura 36); pelo contrário, quando estes linfócitos foram injectados em ratinhos SJL/J com EAE induzida, activamente, por imunização com PLP139-151, houve uma melhoria significativa dos achados clínicos e histológicos, associada a uma redução local da produção de citocinas pró-inflamatórias (Cap. V, Figuras 38 a 41). Conseguimos demonstrar, utilizando linfócitos T Thy1.1a anti-Nogo, que estas células têm a capacidade de penetrar no parênquima encefálico durante a EAE, e, dessa forma, exercerem acções imunomoduladoras localmente (Cap. V, Figura 42). É presumível que estes linfócitos anti-Nogo possam adquirir fenótipos anti-inflamatórios benéficos (como acontece *in vitro*), e que consigam suprimir a capacidade encefalitogénica de outros clones linfocitários anti-mielina, embora não tenhamos conseguido evidência directa deste facto.

A avaliação da resposta humoral nestas duas estirpes, utilizando a tecnologia dos *myelin spotted arrays* descrita no Capítulo IV, revelou que após imunização com os péptidos derivados da sequência Nogo-66, o sistema imune reage de forma idêntica ao que faz com os outros antígenos *major* já conhecidos, PLP139-151 e MBP85-99. Ou seja, para além de uma forte resposta contra o antígeno imunizador, existe evidência de diversificação de epítomos intermolecular, incluindo várias outras proteínas da mielina, como sejam a MBP, MOG, PLP, MAG, CNPase, α -B Cristalina e OSP (Cap. V, Figuras 23 a 28). A dimensão deste fenómeno está relacionada com a presença de resposta T associada, e, por sua vez, com o potencial encefalitogénico destes péptidos: nos ratinhos SJL/J, a maior diversificação está associada ao antígeno Nogo45-66, que é, também, o que desperta a resposta T mais robusta. Notavelmente, a diversificação a partir da Nogo45-66 inclui outros antígenos importantes para esta estirpe, a MAG193-208 e MAG313-328 (208), e a MBP85-99 (209). O aparecimento de diversificação

poderá estar relacionado ou com a existência de reactividade cruzada dos anticorpos anti-Nogo (o que parece pouco provável, dada a especificidade da tecnologia utilizada para os detectar), ou com a destruição da bainha de mielina após imunização, com consequente libertação de novos antígenos e indução local de uma resposta imune mais alargada. Em qualquer das alternativas, a diversificação da resposta humoral após imunização com péptidos Nogo poderá ser, potencialmente, deletéria, visto que estes anticorpos poderão, directa ou indirectamente, danificar a bainha de mielina.

Por outro lado, do ponto de vista da imunoterapia para promoção da regeneração axonal, a diversificação da resposta é, potencialmente, benéfica, uma vez que poderia bloquear, também, outros inibidores mielínicos para além da sequência Nogo utilizada para imunização. No nosso caso, conseguimos detectar anticorpos anti-MAG após imunização; infelizmente, não tínhamos antígenos da OMgp presentes nos *arrays*, o que nos permitiria detectar, também, a presença de anticorpos contra este novo inibidor mielínico. Resta saber, igualmente, se estes anticorpos por nós detectados possuem capacidade bloqueadora *in vitro* e *in vivo*, conferindo-lhes potencial terapêutico para a promoção da regeneração axonal. Se assim for, a imunização anti-Nogo poderá ser uma abordagem terapêutica importante dentro do contexto da regeneração pós-traumática, e mesmo de outras doenças do Sistema Nervoso Central, de causa degenerativa ou inflamatória.

Tal como noutras formas de imunoterapia para doenças neurológicas, os nossos resultados sublinham a necessidade de um conhecimento apurado das características e mecanismos da resposta imune induzida, de forma a evitar efeitos adversos potencialmente graves. No que respeita aos antígenos Nogo, pudemos demonstrar, em determinadas circunstâncias, o seu potencial encefalitogénico; noutras, a sua capacidade imunomoduladora benéfica, dependendo das características da resposta imune induzida, tais como o fenótipo *T_{helper}* ou a diversificação da resposta humoral (Figura 3). A imunização contra neuro-antígenos do próprio deve ser, sempre, encarada

com cautela, dado o risco potencial de desenvolvimento de efeitos adversos, como foi exemplo o aparecimento de meningoencefalites autoimunes no ensaio de vacinação anti-A β para tratamento da doença de Alzheimer (210-213).

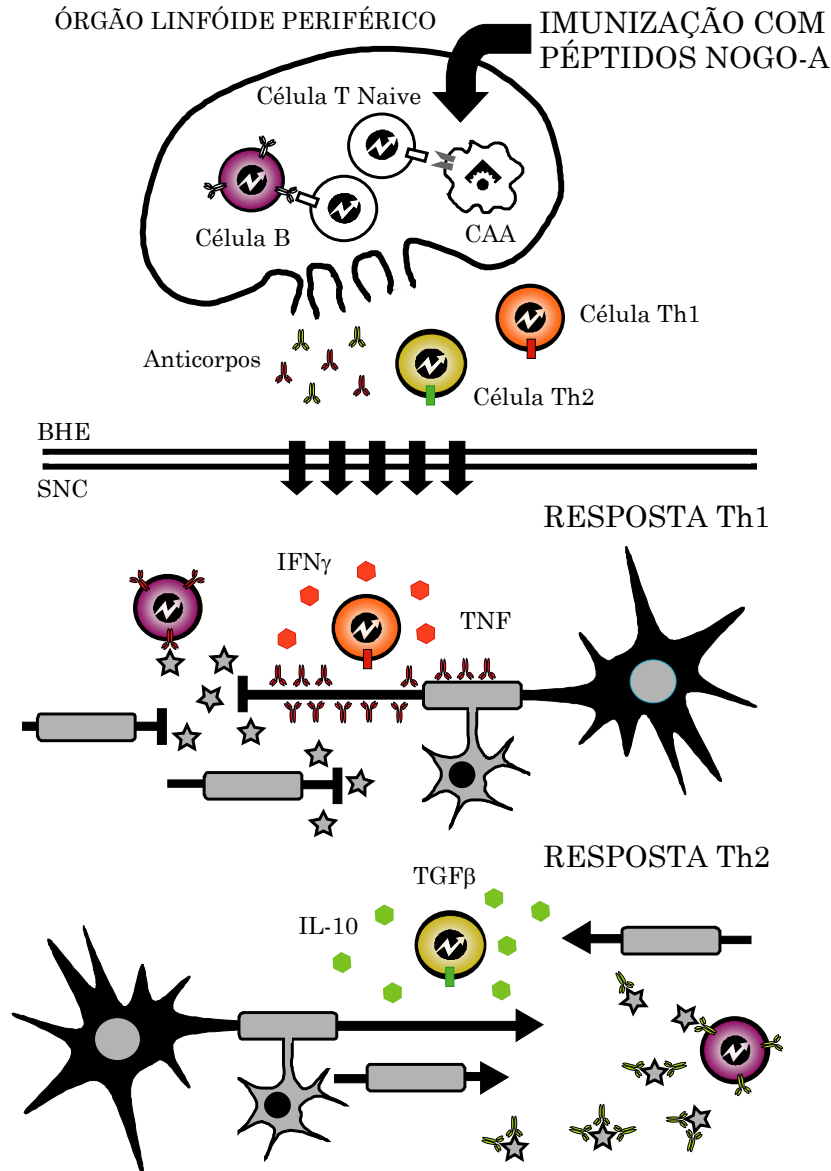


Figura 3. Mecanismos da resposta imune após imunização com Nogo-A na Encefalomielite Autoimune Experimental. A imunização com os peptídeos Nogo623-640 ou Nogo-66 leva à indução de uma resposta linfocitária T (verde/vermelho) e B (púrpura). Dependendo do peptídeo, adjuvante, estirpe animal, a resposta T pode ser Th1 (vermelho) ou Th2 (verde), e a resposta B pode ficar limitada ao peptídeo imunizador, ou exibir diversificação de epítomos. No Sistema Nervoso Central (SNC), consoante o tipo de resposta gerada, os efeitos podem ser benéficos ou prejudiciais. A combinação de uma resposta Th1

forte, com secreção de citocinas pró-inflamatórias, e anticorpos anti-mielina pode causar inflamação e desmielinização (em cima). No caso de uma resposta Th2 (em baixo), citocinas anti-inflamatórias podem ser produzidas localmente; por outro lado, se a diversificação de anticorpos se estender a outros inibidores mielínicos (estrelas cinzentas), a sua acção poderá ser bloqueada, resultando numa melhoria local da regeneração axonal.

Os resultados que apresentámos no Capítulo V deste trabalho, e aqui discutidos, significam que a proteína Nogo-66 poderá juntar-se à lista de autoantigénios associados à EAE e, potencialmente, à EM, conjuntamente com as proteínas MBP, PLP, MOG, MAG e vários outros antigénios *minor* (revistos no Capítulo I). Caso tal se confirme, este novo antigénio poderá ser um alvo, à semelhança do que sucedeu com os restantes, para terapêuticas antigénio-específicas do tipo discutido neste trabalho, como, por exemplo, as vacinas de ADNc por nós desenvolvidas. Estas vacinas foram testadas apenas num conjunto muito restrito de experiências no modelo de EAE, e que não nos permitiram tirar conclusões, pelo que os resultados não foram incluídos neste trabalho; como referimos acima, no modelo de trauma medular, observaram-se efeitos benéficos com a utilização profilática destas vacinas. Resta descobrir até que ponto a resposta imune anti-Nogo se encontra presente no repertório linfocitário de indivíduos saudáveis, e após doenças da substância branca como a EM. São necessários mais estudos nos modelos experimentais, e no humano, de forma a melhor caracterizar a resposta imune anti-Nogo, condição *sine qua non* para o desenvolvimento de terapêuticas relevantes para esta doença, baseadas neste novo autoantigénio.

3. Bibliografia.

1. Wildbaum, G., N. Netzer, and N. Karin. 2002. Plasmid DNA encoding IFN-gamma-inducible protein 10 redirects antigen-specific T cell polarization and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.* 168:5885-5892.
2. Youssef, S., G. Wildbaum, G. Maor, N. Lanir, A. Gour-Lavie, N. Grabie, and N. Karin. 1998. Long-lasting protective immunity to experimental autoimmune encephalomyelitis following vaccination with naked DNA encoding C-C chemokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md.* 161:3870-3879.
3. Youssef, S., G. Wildbaum, and N. Karin. 1999. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by MIP-1alpha and MCP-1 naked DNA vaccines. *Journal of autoimmunity* 13:21-29.
4. Wildbaum, G., and N. Karin. 1999. Augmentation of natural immunity to a pro-inflammatory cytokine (TNF-alpha) by targeted DNA vaccine confers long-lasting resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gene therapy* 6:1128-1138.

5. Wildbaum, G., J. Westermann, G. Maor, and N. Karin. 2000. A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 106:671-679.
6. Matsumoto, Y. 2005. New approach to immunotherapy against organ-specific autoimmune diseases with T cell receptor and chemokine receptor DNA vaccines. *Current drug targets* 5:73-77.
7. Mueller, A.M., X. Pedre, I. Kleiter, M. Hornberg, A. Steinbrecher, and G. Giegerich. 2005. Targeting fibroblast growth factor-inducible-14 signaling protects from chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 159:55-65.
8. Bossu, P., D. Neumann, E. Del Giudice, A. Ciaramella, I. Gloaguen, G. Fantuzzi, C.A. Dinarello, E. Di Carlo, P. Musiani, P.L. Meroni, G. Caselli, P. Ruggiero, and D. Boraschi. 2003. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14181-14186.
9. Lobell, A., R. Weissert, S. Eltayeb, C. Svanholm, T. Olsson, and H. Wigzell. 1999. Presence of CpG DNA and the local cytokine milieu determine the efficacy of suppressive DNA vaccination in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 163:4754-4762.
10. Bohle, B. 2002. CpG motifs as possible adjuvants for the treatment of allergic diseases. *International archives of allergy and immunology* 129:198-203.
11. Jain, V.V., K. Kitagaki, and J.N. Kline. 2003. CpG DNA and immunotherapy of allergic airway diseases. *Clinical and experimental allergy* 33:1330-1335.
12. Weiss, R., P. Hammerl, A. Hartl, R. Hochreiter, W.W. Leitner, S. Scheibelhofer, and J. Thalhamer. 2005. Design of protective and therapeutic DNA vaccines for the treatment of allergic diseases. *Current drug targets* 4:585-597.
13. Boccaccio, G.L., F. Mor, and L. Steinman. 1999. Non-coding plasmid DNA induces IFN-gamma in vivo and suppresses autoimmune encephalomyelitis. *International immunology* 11:289-296.
14. Tsunoda, I., N.D. Tolley, D.J. Theil, J.L. Whitton, H. Kobayashi, and R.S. Fujinami. 1999. Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 9:481-493.
15. Ho, P.P., P. Fontoura, P.J. Ruiz, L. Steinman, and H. Garren. 2003. An immunomodulatory GpG oligonucleotide for the treatment of autoimmunity via the innate and adaptive immune systems. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 171:4920-4926.
16. Waisman, A., P.J. Ruiz, D.L. Hirschberg, A. Gelman, J.R. Oksenberg, S. Brocke, F. Mor, I.R. Cohen, and L. Steinman. 1996. Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity. *Nature medicine* 2:899-905.
17. Kumar, V., and E.E. Sercarz. 1993. The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4⁺ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 178:909-916.
18. Kumar, V., K. Stellrecht, and E. Sercarz. 1996. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *The Journal of experimental medicine* 184:1609-1617.
19. Kumar, V., J. Maglione, J. Thatte, B. Pederson, E. Sercarz, and E.S. Ward. 2001. Induction of a type 1 regulatory CD4 T cell response following V beta 8.2 DNA vaccination results in immune deviation and protection from experimental autoimmune encephalomyelitis. *International immunology* 13:835-841.
20. Matsumoto, Y. 2000. Characterization of T cell receptor (TCR) of organ-specific autoimmune disease-inducing T cells and TCR-based immunotherapy with DNA vaccines. *Journal of neuroimmunology* 110:1-12.
21. Miyakoshi, A., W.K. Yoon, Y. Jee, and Y. Matsumoto. 2003. Characterization of the antigen specificity and TCR repertoire, and TCR-based DNA vaccine therapy in myelin basic protein-induced autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 170:6371-6378.
22. Kwon, S.S., N. Kim, and T.J. Yoo. 2005. The effects of intradermal vaccination with DNA encoding for the T-cell receptor on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in B10.PL mice. *Journal of Korean medical science* 20:1039-1045.
23. Lobell, A., R. Weissert, M.K. Storch, C. Svanholm, K.L. de Graaf, H. Lassmann, R. Andersson, T. Olsson, and H. Wigzell. 1998. Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 187:1543-1548.

24. Weissert, R., A. Lobell, K.L. de Graaf, S.Y. Eltayeb, R. Andersson, T. Olsson, and H. Wigzell. 2000. Protective DNA vaccination against organ-specific autoimmunity is highly specific and discriminates between single amino acid substitutions in the peptide autoantigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:1689-1694.
25. Lobell, A., R. Weissert, S. Eltayeb, K.L. de Graaf, J. Wefer, M.K. Storch, H. Lassmann, H. Wigzell, and T. Olsson. 2003. Suppressing DNA vaccination in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis involves a T1-biased immune response. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 170:1806-1813.
26. Wefer, J., A. Andersson, A. Flores-Morales, R.A. Harris, and A. Lobell. 2004. Microarray analysis of the in vivo effects of DNA vaccination on rat experimental autoimmune encephalomyelitis reveals genes associated with plasmacytoid dendritic cells [resumo]. *Journal of Neuroimmunology* 154:88.
27. Wefer, J., R.A. Harris, and A. Lobell. 2004. Protective DNA vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with induction of IFN β . *Journal of neuroimmunology* 149:66-76.
28. Tsunoda, I., L.-Q. Kuang, N.D. Tolley, J.L. Whitton, and R.S. Fujinami. 1998. Enhancement of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by DNA immunization with myelin proteolipid protein (PLP) plasmid DNA. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:758-767.
29. Tolley, N.D., I. Tsunoda, and R.S. Fujinami. 1999. DNA vaccination against Theiler's murine encephalomyelitis virus leads to alterations in demyelinating disease. *Journal of virology* 73:993-1000.
30. Bourquin, C., A. Iglesias, T. Berger, H. Wekerle, and C. Linington. 2000. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-DNA vaccination induces antibody-mediated autoaggression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology* 30:3663-3671.
31. Selmaj, K., C. Kowal, A. Walczak, J. Nowicka, and C.S. Raine. 2000. Naked DNA vaccination differentially modulates autoimmune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 111:34-44.
32. Walczak, A., B. Szymanska, and K. Selmaj. 2004. Differential prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis with antigen-specific DNA vaccination. *Clinical neurology and neurosurgery* 106:241-245.
33. Gauvrit, A., M. Debailleul, A.T. Vu, P. Sai, and J.M. Bach. 2004. DNA vaccination encoding glutamic acid decarboxylase can enhance insulinitis and diabetes in correlation with a specific Th2/3 CD4 T cell response in non-obese diabetic mice. *Clinical and experimental immunology* 137:253-262.
34. Karges, W., K. Pechhold, S. Al Dahouk, I. Riegger, M. Rief, A. Wissmann, R. Schirmbeck, C. Barth, and B.O. Boehm. 2002. Induction of autoimmune diabetes through insulin (but not GAD65) DNA vaccination in nonobese diabetic and in RIP-B7.1 mice. *Diabetes* 51:3237-3244.
35. Weaver, D.J., Jr., B. Liu, and R. Tisch. 2001. Plasmid DNAs encoding insulin and glutamic acid decarboxylase 65 have distinct effects on the progression of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 167:586-592.
36. Fontoura, P., H. Garren, and L. Steinman. 2005. Antigen-specific therapies in multiple sclerosis: going beyond proteins and peptides. *International reviews of immunology* 24:415-446.
37. Ruiz, P.J., H. Garren, I.U. Ruiz, D.L. Hirschberg, L.V. Nguyen, M.V. Karpuz, M.T. Cooper, D.J. Mitchell, C.G. Fathman, and L. Steinman. 1999. Suppressing immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: modulation of T cell costimulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 162:3336-3341.
38. Garren, H., P.J. Ruiz, T.A. Watkins, P. Fontoura, L.T. Nguyen, E.R. Estline, D.L. Hirschberg, and L. Steinman. 2001. Combination of gene delivery and DNA vaccination to protect from and reverse Th1 autoimmune disease via deviation to the Th2 pathway. *Immunity* 15:15-22.
39. Robinson, W.H., C. DiGennaro, W. Hueber, B.B. Haab, M. Kamachi, E.J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M.C. Genovese, H.E. de Vegvar, K. Skriner, D.L. Hirschberg, R.I. Morris, S. Muller, G.J. Pruijn, W.J. van Venrooij, J.S. Smolen, P.O. Brown, L. Steinman, and P.J. Utz. 2002. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nature medicine* 8:295-301.
40. Robinson, W.H., H. Garren, P.J. Utz, and L. Steinman. 2002. Millennium Award. Proteomics for the development of DNA tolerizing vaccines to treat autoimmune disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 103:7-12.
41. Robinson, W.H., P. Fontoura, B.J. Lee, H.E. de Vegvar, J. Tom, R. Pedotti, C.D. DiGennaro, D.J. Mitchell, D. Fong, P.P. Ho, P.J. Ruiz, E. Mavarakis, D.B. Stevens, C.C. Bernard, R. Martin, V.K. Kuchroo, J.M. van Noort, C.P. Genain, S. Amor, T. Olsson, P.J. Utz, H. Garren,

- and L. Steinman. 2003. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nature biotechnology* 21:1033-1039.
42. Ho, P.P., P. Fontoura, M. Platten, R.A. Sobel, J.J. DeVoss, L.Y. Lee, B.A. Kidd, B.H. Tomooka, J. Capers, A. Agrawal, R. Gupta, J. Zernik, M.K. Yee, B.J. Lee, H. Garren, W.H. Robinson, and L. Steinman. 2005. A suppressive oligodeoxynucleotide enhances the efficacy of myelin cocktail/IL-4-tolerizing DNA vaccination and treats autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 175:6226-6234.
43. Fontoura, P., H. Garren, W.H. Robinson, L. Steinman, P.J. Ruiz, and P.J. Utz. 2003. Polynucleotide therapy. Número de patente 10/302,098, USA. 34 pp.
44. Youssef, S., O. Stuve, J.C. Patarroyo, P.J. Ruiz, J.L. Radosevich, E.M. Hur, M. Bravo, D.J. Mitchell, R.A. Sobel, L. Steinman, and S.S. Zamvil. 2002. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420:78-84.
45. Sena, A., R. Pedrosa, and M. Graca Morais. 2003. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *Journal of neurology* 250:754-755.
46. Vollmer, T., L. Key, V. Durkalski, W. Tyor, J. Corboy, S. Markovic-Plese, J. Preiningerova, M. Rizzo, and I. Singh. 2004. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363:1607-1608.
47. Menge, T., H.P. Hartung, and O. Stuve. 2005. Statins--a cure-all for the brain? *Nature reviews* 6:325-331.
48. Neuhaus, O., O. Stuve, S.S. Zamvil, and H.P. Hartung. 2005. Evaluation of HMG-CoA reductase inhibitors for multiple sclerosis: opportunities and obstacles. *CNS drugs* 19:833-841.
49. Prasad, R., S. Giri, N. Nath, I. Singh, and A.K. Singh. 2005. Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. *Journal of neurochemistry* 94:204-214.
50. Waiczies, S., T. Prozorovski, C. Infante-Duarte, A. Hahner, O. Aktas, O. Ullrich, and F. Zipp. 2005. Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 174:5630-5635.
51. Dunn, S.E., S. Youssef, M.J. Goldstein, T. Prod'homme, M.S. Weber, S.S. Zamvil, and L. Steinman. 2006. Isoprenoids determine Th1/Th2 fate in pathogenic T cells, providing a mechanism of modulation of autoimmunity by atorvastatin. *The Journal of experimental medicine* 203:401-412.
52. Stuve, O., S. Youssef, M.S. Weber, S. Nessler, H.C. von Budingen, B. Hemmer, T. Prod'homme, R.A. Sobel, L. Steinman, and S.S. Zamvil. 2006. Immunomodulatory synergy by combination of atorvastatin and glatiramer acetate in treatment of CNS autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* 116:1037-1044.
53. Garren, H., N. Solvason, J. Bao, F. Valone, and L. Steinman. 2004. A DNA vaccine and atorvastatin combination treats the EAE model of MS [resumo]. *J Neuroimmunol* 154:84.
54. Vollmer, T., Y. Lapierre, L. Weiner, J. Ogel, A. Bar-Or, D. Arnold, D. Campagnolo, W. Barkas, J. Antel, N. Kachuck, H. Garren, J. Gianettoni, L. Steinman, and F. Valone. 2006. Phase I/II trial of a MBP encoding DNA plasmid (BHT-3009) alone or combined with atorvastatin for treatment of Multiple Sclerosis [resumo]. In American Academy of Neurology, San Diego.
55. Bar-Or, A., J. Antel, C.A. Bodner, D. Campagnolo, J. Gianettoni, F. Jalili, N. Kachuck, Y. Lapierre, M. Niino, J. Oger, M. Price, S. Rhodes, F.-D. Shi, L. Steinman, F. Valone, T. Vollmer, L. Weiner, and H. Garren. 2006. Antigen-specific immunomodulation in Multiple Sclerosis patients treated with MBP encoding DNA plasmid (BHT-3009) alone or combined with atorvastatin [resumo]. In American Academy of Neurology, San Diego.
56. Garren, H., J. Antel, A. Bar-Or, C.A. Bodner, D. Campagnolo, J. Gianettoni, F. Jalili, N. Kachuck, Y. Lapierre, M. Niino, J. Ogel, M. Price, S. Rhodes, W.H. Robinson, F.-D. Shi, F. Valone, T. Vollmer, and L. Steinman. 2006. Phase I/II trial of a MBP encoding DNA plasmid (BHT-3009) alone or combined with atorvastatin for treatment of MS. *J Neuroimmunol* 178 (Suppl1):210.
57. Kanter, J.L., S. Narayana, P.P. Ho, I. Catz, K.G. Warren, R.A. Sobel, L. Steinman, and W.H. Robinson. 2006. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature medicine* 12:138-143.
58. Villar, L.M., M.C. Sadaba, E. Roldan, J. Masjuan, P. Gonzalez-Porquer, N. Villarrubia, M. Espino, J.A. Garcia-Trujillo, A. Bootello, and J.C. Alvarez-Cermeno. 2005. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of clinical investigation* 115:187-194.
59. McGuinness, M.C., and K.D. Smith. 1999. Cerebral inflammation in X-linked adrenoleukodystrophy. *Archivum immunologiae et therapiiae experimentalis* 47:281-287.

60. Powers, J.M., Y. Liu, A.B. Moser, and H.W. Moser. 1992. The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 51:630-643.
61. Dubois-Dalcq, M., V. Feigenbaum, and P. Aubourg. 1999. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends in neurosciences* 22:4-12.
62. Filbin, M.T. 2003. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature reviews* 4:703-713.
63. Berry, M. 1982. Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: an hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian central nervous system. *Bibliotheca anatomica*:1-11.
64. Crutcher, K.A. 1989. Tissue sections from the mature rat brain and spinal cord as substrates for neurite outgrowth in vitro: extensive growth on gray matter but little growth on white matter. *Experimental neurology* 104:39-54.
65. Sandvig, A., M. Berry, L.B. Barrett, A. Butt, and A. Logan. 2004. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46:225-251.
66. McKerracher, L., S. David, D.L. Jackson, V. Kottis, R.J. Dunn, and P.E. Braun. 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13:805-811.
67. Mukhopadhyay, G., P. Doherty, F.S. Walsh, P.R. Crocker, and M.T. Filbin. 1994. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13:757-767.
68. Li, M., A. Shibata, C. Li, P.E. Braun, L. McKerracher, J. Roder, S.B. Kater, and S. David. 1996. Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *Journal of neuroscience research* 46:404-414.
69. Caroni, P., and M.E. Schwab. 1988. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *The Journal of cell biology* 106:1281-1288.
70. Schwab, M.E., and P. Caroni. 1988. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *The Journal of neuroscience* 8:2381-2393.
71. Ng, W.P., N. Cartel, J. Roder, A. Roach, and A. Lozano. 1996. Human central nervous system myelin inhibits neurite outgrowth. *Brain research* 720:17-24.
72. Savio, T., and M.E. Schwab. 1990. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:4130-4133.
73. Weibel, D., D. Cadelli, and M.E. Schwab. 1994. Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain research* 642:259-266.
74. Bandtlow, C., W. Schiweck, H.H. Tai, M.E. Schwab, and A. Skerra. 1996. The Escherichia coli-derived Fab fragment of the IgM/kappa antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth. *European journal of biochemistry / FEBS* 241:468-475.
75. Caroni, P., and M.E. Schwab. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1:85-96.
76. Rubin, B.P., I. Dusart, and M.E. Schwab. 1994. A monoclonal antibody (IN-1) which neutralizes neurite growth inhibitory proteins in the rat CNS recognizes antigens localized in CNS myelin. *Journal of neurocytology* 23:209-217.
77. Spillmann, A.A., C.E. Bandtlow, F. Lottspeich, F. Keller, and M.E. Schwab. 1998. Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *The Journal of biological chemistry* 273:19283-19293.
78. Chen, M.S., A.B. Huber, M.E. van der Haar, M. Frank, L. Schnell, A.A. Spillmann, F. Christ, and M.E. Schwab. 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403:434-439.
79. GrandPre, T., F. Nakamura, T. Vartanian, and S.M. Strittmatter. 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403:439-444.
80. Prinjha, R., S.E. Moore, M. Vinson, S. Blake, R. Morrow, G. Christie, D. Michalovich, D.L. Simmons, and F.S. Walsh. 2000. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403:383-384.
81. Huber, A.B., and M.E. Schwab. 2000. Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biological chemistry* 381:407-419.
82. Goldberg, J.L., and B.A. Barres. 2000. Nogo in nerve regeneration. *Nature* 403:369-370.
83. Tessier-Lavigne, M., and C.S. Goodman. 2000. Perspectives: neurobiology. Regeneration in the Nogo zone. *Science* 287:813-814.

84. Oertle, T., and M.E. Schwab. 2003. Nogo and its paRTNers. *Trends in cell biology* 13:187-194.
85. Oertle, T., M. Klinger, C.A. Stuermer, and M.E. Schwab. 2003. A reticular rhapsody: phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *The FASEB journal* 17:1238-1247.
86. Fournier, A.E., T. GrandPre, and S.M. Strittmatter. 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409:341-346.
87. Oertle, T., M.E. van der Haar, C.E. Bandtlow, A. Robeva, P. Burfeind, A. Buss, A.B. Huber, M. Simonen, L. Schnell, C. Brosamle, K. Kaupmann, R. Vallon, and M.E. Schwab. 2003. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *The Journal of neuroscience* 23:5393-5406.
88. Li, M., J. Shi, Z. Wei, F.Y. Teng, B.L. Tang, and J. Song. 2004. Structural characterization of the human Nogo-A functional domains. Solution structure of Nogo-40, a Nogo-66 receptor antagonist enhancing injured spinal cord regeneration. *European journal of biochemistry / FEBS* 271:3512-3522.
89. Brittis, P.A., and J.G. Flanagan. 2001. Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration. *Neuron* 30:11-14.
90. He, X.L., J.F. Bazan, G. McDermott, J.B. Park, K. Wang, M. Tessier-Lavigne, Z. He, and K.C. Garcia. 2003. Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron* 38:177-185.
91. Barton, W.A., B.P. Liu, D. Tzvetkova, P.D. Jeffrey, A.E. Fournier, D. Sah, R. Cate, S.M. Strittmatter, and D.B. Nikolov. 2003. Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *The EMBO journal* 22:3291-3302.
92. Niederost, B., T. Oertle, J. Fritsche, R.A. McKinney, and C.E. Bandtlow. 2002. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *The Journal of neuroscience* 22:10368-10376.
93. He, Z., and V. Koprivica. 2004. The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annual review of neuroscience* 27:341-368.
94. Wang, X., S.J. Chun, H. Treloar, T. Vartanian, C.A. Greer, and S.M. Strittmatter. 2002. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *The Journal of neuroscience* 22:5505-5515.
95. Pignot, V., A.E. Hein, C. Barske, C. Wiessner, A.R. Walmsley, K. Kaupmann, H. Mayeur, B. Sommer, A.K. Mir, and S. Frenzel. 2003. Characterization of two novel proteins, NgRH1 and NgRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *Journal of neurochemistry* 85:717-728.
96. Venkatesh, K., O. Chivatakarn, H. Lee, P.S. Joshi, D.B. Kantor, B.A. Newman, R. Mage, C. Rader, and R.J. Giger. 2005. The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *The Journal of neuroscience* 25:808-822.
97. Hu, F., B.P. Liu, S. Budel, J. Liao, J. Chin, A. Fournier, and S.M. Strittmatter. 2005. Nogo-A interacts with the Nogo-66 receptor through multiple sites to create an isoform-selective subnanomolar agonist. *The Journal of neuroscience* 25:5298-5304.
98. Wang, K.C., J.A. Kim, R. Sivasankaran, R. Segal, and Z. He. 2002. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420:74-78.
99. Bronfman, F.C., and M. Fainzilber. 2004. Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO reports* 5:867-871.
100. Mi, S., X. Lee, Z. Shao, G. Thill, B. Ji, J. Relton, M. Levesque, N. Allaire, S. Perrin, B. Sands, T. Crowell, R.L. Cate, J.M. McCoy, and R.B. Pepinsky. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nature neuroscience* 7:221-228.
101. Mi, S., R.H. Miller, X. Lee, M.L. Scott, S. Shulag-Morskaya, Z. Shao, J. Chang, G. Thill, M. Levesque, M. Zhang, C. Hession, D. Sah, B. Trapp, Z. He, V. Jung, J.M. McCoy, and R.B. Pepinsky. 2005. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nature neuroscience* 8:745-751.
102. Chen, Y., S. Aulia, L. Li, and B.L. Tang. 2006. AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain research* 51:265-274.
103. Shao, Z., J.L. Browning, X. Lee, M.L. Scott, S. Shulga-Morskaya, N. Allaire, G. Thill, M. Levesque, D. Sah, J.M. McCoy, B. Murray, V. Jung, R.B. Pepinsky, and S. Mi. 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 45:353-359.
104. Park, J.B., G. Yiu, S. Kaneko, J. Wang, J. Chang, X.L. He, K.C. Garcia, and Z. He. 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45:345-351.

105. Domeniconi, M., Z. Cao, T. Spencer, R. Sivasankaran, K. Wang, E. Nikulina, N. Kimura, H. Cai, K. Deng, Y. Gao, Z. He, and M. Filbin. 2002. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35:283-290.
106. Liu, B.P., A. Fournier, T. GrandPre, and S.M. Strittmatter. 2002. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 297:1190-1193.
107. Wang, K.C., V. Koprivica, J.A. Kim, R. Sivasankaran, Y. Guo, R.L. Neve, and Z. He. 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-944.
108. Hu, W.H., O.N. Hausmann, M.S. Yan, W.M. Walters, P.K. Wong, and J.R. Bethea. 2002. Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein (NIMP). *Journal of neurochemistry* 81:36-45.
109. Tagami, S., Y. Eguchi, M. Kinoshita, M. Takeda, and Y. Tsujimoto. 2000. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* 19:5736-5746.
110. Qi, B., Y. Qi, A. Watari, N. Yoshioka, H. Inoue, Y. Minemoto, K. Yamashita, T. Sasagawa, and M. Yutsudo. 2003. Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. *Journal of cellular physiology* 196:312-318.
111. Nie, D.Y., Z.H. Zhou, B.T. Ang, F.Y. Teng, G. Xu, T. Xiang, C.Y. Wang, L. Zeng, Y. Takeda, T.L. Xu, Y.K. Ng, C. Faivre-Sarrailh, B. Popko, E.A. Ling, M. Schachner, K. Watanabe, C.J. Pallen, B.L. Tang, and Z.C. Xiao. 2003. Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K(+) channel localization. *The EMBO journal* 22:5666-5678.
112. Taketomi, M., N. Kinoshita, K. Kimura, M. Kitada, T. Noda, H. Asou, T. Nakamura, and C. Ide. 2002. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules. *Neuroscience letters* 332:37-40.
113. Teng, F.Y., B.M. Ling, and B.L. Tang. 2004. Inter- and intracellular interactions of Nogo: new findings and hypothesis. *Journal of neurochemistry* 89:801-806.
114. Tozaki, H., T. Kawasaki, Y. Takagi, and T. Hirata. 2002. Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain research* 104:111-119.
115. Mingorance, A., X. Fontana, M. Sole, F. Burgaya, J.M. Urena, F.Y. Teng, B.L. Tang, D. Hunt, P.N. Anderson, J.R. Bethea, M.E. Schwab, E. Soriano, and J.A. del Rio. 2004. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Molecular and cellular neurosciences* 26:34-49.
116. Mingorance, A., E. Soriano-Garcia, and J.A. del Rio. 2004. [Nogo-A functions during the development of the central nervous system and in the adult]. *Revista de neurologia* 39:440-446.
117. Weiss, J., B. Takizawa, A. McGee, W.B. Stewart, H. Zhang, L. Ment, M. Schwartz, and S. Strittmatter. 2004. Neonatal hypoxia suppresses oligodendrocyte Nogo-A and increases axonal sprouting in a rodent model for human prematurity. *Experimental neurology* 189:141-149.
118. Buss, A., B. Sellhaus, A. Wolmsley, J. Noth, M.E. Schwab, and G.A. Brook. 2005. Expression pattern of Nogo-A protein in the human nervous system. *Acta neuropathologica* 110:113-119.
119. Huber, A.B., O. Weinmann, C. Brosamle, T. Oertle, and M.E. Schwab. 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *The Journal of neuroscience* 22:3553-3567.
120. Hasegawa, T., K. Ohno, M. Sano, T. Omura, K. Omura, A. Nagano, and K. Sato. 2005. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo-A and Nogo-receptor in the rat central nervous system. *Brain research* 133:119-130.
121. Trifunovski, A., A. Josephson, P.C. Bickford, L. Olson, and S. Brene. 2006. Selective decline of Nogo mRNA in the aging brain. *Neuroreport* 17:913-916.
122. Hunt, D., R.S. Coffin, R.K. Prinjha, G. Campbell, and P.N. Anderson. 2003. Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Molecular and cellular neurosciences* 24:1083-1102.
123. Josephson, A., J. Widenfalk, H.W. Widmer, L. Olson, and C. Spenger. 2001. Nogo mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Experimental neurology* 169:319-328.
124. Satoh, J., H. Onoue, K. Arima, and T. Yamamura. 2005. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64:129-138.
125. Woolf, C.J. 2003. No Nogo: now where to go? *Neuron* 38:153-156.
126. Kim, J.E., S. Li, T. GrandPre, D. Qiu, and S.M. Strittmatter. 2003. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 38:187-199.
127. Simonen, M., V. Pedersen, O. Weinmann, L. Schnell, A. Buss, B. Ledermann, F. Christ, G. Sansig, H. van der Putten, and M.E. Schwab. 2003. Systemic deletion of the myelin-

- associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38:201-211.
128. Zheng, B., C. Ho, S. Li, H. Keirstead, O. Steward, and M. Tessier-Lavigne. 2003. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38:213-224.
129. Kim, J.E., B.P. Liu, J.H. Park, and S.M. Strittmatter. 2004. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron* 44:439-451.
130. Zheng, B., J. Atwal, C. Ho, L. Case, X.L. He, K.C. Garcia, O. Steward, and M. Tessier-Lavigne. 2005. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1205-1210.
131. Song, X.Y., J.H. Zhong, X. Wang, and X.F. Zhou. 2004. Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice. *The Journal of neuroscience* 24:542-546.
132. Teng, F.Y., and B.L. Tang. 2005. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents? *Journal of neurochemistry* 94:865-874.
133. Fontoura, P., and L. Steinman. 2006. Nogo in multiple sclerosis: growing roles of a growth inhibitor. *Journal of the neurological sciences* 245:201-210.
134. Thuret, S., L.D. Moon, and F.H. Gage. 2006. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature reviews* 7:628-643.
135. Dietz, V., and A. Curt. 2006. Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. *Lancet neurology* 5:688-694.
136. Bracken, M.B., M.J. Shepard, T.R. Holford, L. Leo-Summers, E.F. Aldrich, M. Fazl, M. Fehlings, D.L. Herr, P.W. Hitchon, L.F. Marshall, R.P. Nockels, V. Pascale, P.L. Perot, Jr., J. Piepmeier, V.K. Sonntag, F. Wagner, J.E. Wilberger, H.R. Winn, and W. Young. 1997. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *Jama* 277:1597-1604.
137. Bracken, M.B. 2002. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*:CD001046.
138. Sayer, F.T., E. Kronvall, and O.G. Nilsson. 2006. Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. *The spine journal* 6:335-343.
139. David, S., and A.J. Aguayo. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214:931-933.
140. Fouad, K., V. Dietz, and M.E. Schwab. 2001. Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors. *Brain research* 36:204-212.
141. Schweigreiter, R., and C.E. Bandtlow. 2006. Nogo in the injured spinal cord. *Journal of neurotrauma* 23:384-396.
142. Buchli, A.D., and M.E. Schwab. 2005. Inhibition of Nogo: a key strategy to increase regeneration, plasticity and functional recovery of the lesioned central nervous system. *Annals of medicine* 37:556-567.
143. Buffo, A., M. Zagrebelsky, A.B. Huber, A. Skerra, M.E. Schwab, P. Strata, and F. Rossi. 2000. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *The Journal of neuroscience* 20:2275-2286.
144. Brosamle, C., A.B. Huber, M. Fiedler, A. Skerra, and M.E. Schwab. 2000. Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *The Journal of neuroscience* 20:8061-8068.
145. Merkler, D., G.A. Metz, O. Raineteau, V. Dietz, M.E. Schwab, and K. Fouad. 2001. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *The Journal of neuroscience* 21:3665-3673.
146. Bareyre, F.M., B. Haudenschild, and M.E. Schwab. 2002. Long-lasting sprouting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord. *The Journal of neuroscience* 22:7097-7110.
147. GrandPre, T., S. Li, and S.M. Strittmatter. 2002. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417:547-551.
148. Fournier, A.E., G.C. Gould, B.P. Liu, and S.M. Strittmatter. 2002. Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *The Journal of neuroscience* 22:8876-8883.
149. Basso, D.M., M.S. Beattie, and J.C. Bresnahan. 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma* 12:1-21.

150. Oudega, M., C. Rosano, D. Sadi, P.M. Wood, M.E. Schwab, and T. Hagg. 2000. Neutralizing antibodies against neurite growth inhibitor NI-35/250 do not promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 100:873-883.
151. Fouad, K., I. Klusman, and M.E. Schwab. 2004. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *The European journal of neuroscience* 20:2479-2482.
152. Freund, P., E. Schmidlin, T. Wannier, J. Bloch, A. Mir, M.E. Schwab, and E.M. Rouiller. 2006. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nature medicine* 12:790-792.
153. Bradbury, E.J., L.D. Moon, R.J. Popat, V.R. King, G.S. Bennett, P.N. Patel, J.W. Fawcett, and S.B. McMahon. 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
154. Caggiano, A.O., M.P. Zimmer, A. Ganguly, A.R. Blight, and E.A. Gruskin. 2005. Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *Journal of neurotrauma* 22:226-239.
155. Barritt, A.W., M. Davies, F. Marchand, R. Hartley, J. Grist, P. Yip, S.B. McMahon, and E.J. Bradbury. 2006. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience* 26:10856-10867.
156. Blesch, A., and M.H. Tuszynski. 2002. Spontaneous and neurotrophin-induced axonal plasticity after spinal cord injury. *Progress in brain research* 137:415-423.
157. Vavrek, R., J. Girgis, W. Tetzlaff, G.W. Hiebert, and K. Fouad. 2006. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats. *Brain* 129:1534-1545.
158. Schnell, L., R. Schneider, R. Kolbeck, Y.A. Barde, and M.E. Schwab. 1994. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367:170-173.
159. McDonald, J.W., and M.J. Howard. 2002. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Progress in brain research* 137:299-309.
160. Garbossa, D., M. Fontanella, C. Fronda, C. Benevello, G. Muraca, A. Ducati, and A. Vercelli. 2006. New strategies for repairing the injured spinal cord: the role of stem cells. *Neurological research* 28:500-504.
161. Boyd, J.G., R. Doucette, and M.D. Kawaja. 2005. Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *The FASEB journal* 19:694-703.
162. Barnett, S.C., and J.S. Riddell. 2004. Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats. *Journal of anatomy* 204:57-67.
163. Wang, H., Y. Yao, X. Jiang, D. Chen, Y. Xiong, and D. Mu. 2006. Expression of Nogo-A and NgR in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain research* 1114:212-220.
164. Sadler, R.M. 2006. The syndrome of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: clinical features and differential diagnosis. *Adv Neurol* 97:27-37.
165. Meier, S., A.U. Brauer, B. Heimrich, M.E. Schwab, R. Nitsch, and N.E. Savaskan. 2003. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *The FASEB journal* 17:1153-1155.
166. Bandtlow, C.E., M. Dlaska, S. Pirker, T. Czech, C. Baumgartner, and G. Sperk. 2004. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy. *The European journal of neuroscience* 20:195-206.
167. Arnold, S.E., K. Talbot, and C.G. Hahn. 2005. Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia. *Prog Brain Res* 147:319-345.
168. Jarskog, L.F., L.A. Glantz, J.H. Gilmore, and J.A. Lieberman. 2005. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:846-858.
169. Novak, G., D. Kim, P. Seeman, and T. Talerico. 2002. Schizophrenia and Nogo: elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. *Brain research* 107:183-189.
170. Novak, G., and T. Talerico. 2006. Nogo A, B and C expression in schizophrenia, depression and bipolar frontal cortex, and correlation of Nogo expression with CAA/TATC polymorphism in 3'-UTR. *Brain research* 1120:161-171.
171. Tan, E.C., S.A. Chong, H. Wang, E. Chew-Ping Lim, and Y.Y. Teo. 2005. Gender-specific association of insertion/deletion polymorphisms in the nogo gene and chronic schizophrenia. *Brain research* 139:212-216.
172. Covault, J., J. Lee, K. Jensen, and H. Kranzler. 2004. Nogo 3'-untranslated region CAA insertion: failure to replicate association with schizophrenia and demonstration of marked population difference in frequency of the insertion. *Brain research* 120:197-200.

173. Xiong, L., G.A. Rouleau, L.E. Delisi, J. St-Onge, R. Najafee, J.B. Riviere, C. Benkelfat, K. Tabbane, F. Fathalli, Z. Danics, A. Labelle, S. Lal, and R. Joobar. 2005. CAA insertion polymorphism in the 3'UTR of Nogo gene on 2p14 is not associated with schizophrenia. *Brain research* 133:153-156.
174. Sinibaldi, L., A. De Luca, E. Bellacchio, E. Conti, A. Pasini, C. Paloscia, G. Spalletta, C. Caltagirone, A. Pizzuti, and B. Dallapiccola. 2004. Mutations of the Nogo-66 receptor (RTN4R) gene in schizophrenia. *Human mutation* 24:534-535.
175. Meng, J., Y. Shi, X. Zhao, S. Guo, H. Wang, Y. Zheng, R. Tang, G. Feng, N. Gu, H. Liu, S. Zhu, and L. He. 2006. No association between the genetic polymorphisms in the RTN4R gene and schizophrenia in the Chinese population.
176. Park, J.H., D.A. Gimbel, T. GrandPre, J.K. Lee, J.E. Kim, W. Li, D.H. Lee, and S.M. Strittmatter. 2006. Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *The Journal of neuroscience* 26:1386-1395.
177. Gil, V., O. Nicolas, A. Mingorance, J.M. Urena, B.L. Tang, T. Hirata, J. Saez-Valero, I. Ferrer, E. Soriano, and J.A. del Rio. 2006. Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65:433-444.
178. Strittmatter, S.M. 2002. Modulation of axonal regeneration in neurodegenerative disease: focus on Nogo. *Journal of molecular neuroscience* 19:117-121.
179. Acevedo, L., J. Yu, H. Erdjument-Bromage, R.Q. Miao, J.E. Kim, D. Fulton, P. Tempst, S.M. Strittmatter, and W.C. Sessa. 2004. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nature medicine* 10:382-388.
180. Miao, R.Q., Y. Gao, K.D. Harrison, J. Prendergast, L.M. Acevedo, J. Yu, F. Hu, S.M. Strittmatter, and W.C. Sessa. 2006. Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:10997-11002.
181. Wiessner, C., F.M. Bareyre, P.R. Allegrini, A.K. Mir, S. Frentzel, M. Zurini, L. Schnell, T. Oertle, and M.E. Schwab. 2003. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 23:154-165.
182. Lee, J.K., J.E. Kim, M. Sivula, and S.M. Strittmatter. 2004. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *The Journal of neuroscience* 24:6209-6217.
183. Seymour, A.B., E.M. Andrews, S.Y. Tsai, T.M. Markus, M.R. Bollnow, M.M. Brenneman, T.E. O'Brien, A.J. Castro, M.E. Schwab, and G.L. Kartje. 2005. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 25:1366-1375.
184. Markus, T.M., S.Y. Tsai, M.R. Bollnow, R.G. Farrer, T.E. O'Brien, D.R. Kindler-Baumann, M. Rausch, M. Rudin, C. Wiessner, A.K. Mir, M.E. Schwab, and G.L. Kartje. 2005. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Annals of neurology* 58:950-953.
185. Dupuis, L., J.L. Gonzalez de Aguilar, F. di Scala, F. Rene, M. de Tapia, P.F. Pradat, L. Lacomblez, D. Seihlan, R. Prinjha, F.S. Walsh, V. Meininger, and J.P. Loeffler. 2002. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* 10:358-365.
186. Magnusson, C., R. Libelius, and S. Tagerud. 2003. Nogo (Reticulon 4) expression in innervated and denervated mouse skeletal muscle. *Molecular and cellular neurosciences* 22:298-307.
187. Jokic, N., J.L. Gonzalez de Aguilar, P.F. Pradat, L. Dupuis, A. Echaniz-Laguna, A. Muller, O. Dubourg, D. Seilhean, J.J. Hauw, J.P. Loeffler, and V. Meininger. 2005. Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Annals of neurology* 57:553-556.
188. Jokic, N., J.L. Gonzalez de Aguilar, L. Dimou, S. Lin, A. Fergani, M.A. Ruegg, M.E. Schwab, L. Dupuis, and J.P. Loeffler. 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO reports* 7:1162-1167.
189. Li, Q., B. Qi, K. Oka, M. Shimakage, N. Yoshioka, H. Inoue, A. Hakura, K. Kodama, E.J. Stanbridge, and M. Yutsudo. 2001. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene* 20:3929-3936.
190. Chen, Y., X. Tang, X. Cao, H. Chen, and X. Zhang. 2006. Human Nogo-C overexpression induces HEK293 cell apoptosis via a mechanism that involves JNK-c-Jun pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 348:923-928.
191. Oertle, T., D. Merkler, and M.E. Schwab. 2003. Do cancer cells die because of Nogo-B? *Oncogene* 22:1390-1399.

192. Shimakage, M., N. Inoue, K. Ohshima, K. Kawahara, T. Oka, K. Yasui, K. Matsumoto, H. Inoue, A. Watari, S. Higashiyama, and M. Yutsudo. 2006. Down-regulation of ASY/Nogo transcription associated with progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer* 119:1648-1653.
193. Liao, H., T. Duka, F.Y. Teng, L. Sun, W.Y. Bu, S. Ahmed, B.L. Tang, and Z.C. Xiao. 2004. Nogo-66 and myelin-associated glycoprotein (MAG) inhibit the adhesion and migration of Nogo-66 receptor expressing human glioma cells. *J Neurochem* 90:1156-1162.
194. Teng, F.Y., and B.L. Tang. 2005. No go for brain tumors? *Journal of molecular neuroscience* 25:1-6.
195. Gregorio, S.P., F.B. Mury, E.B. Ojopi, P.C. Sallet, D.H. Moreno, J. Yacubian, H. Tavares, F.R. Santos, W.F. Gattaz, and E. Dias-Neto. 2005. Nogo CAA 3'UTR Insertion polymorphism is not associated with Schizophrenia nor with bipolar disorder. *Schizophrenia research* 75:5-9.
196. Eslamboli, A., R.I. Grundy, and E.A. Irving. 2006. Time-dependent increase in Nogo-A expression after focal cerebral ischemia in marmoset monkeys. *Neuroscience letters* 408:89-93.
197. Satoh, J.I., and Y. Kuroda. 2002. Cytokines and neurotrophic factors fail to affect Nogo-A mRNA expression in differentiated human neurones: implications for inflammation-related axonal regeneration in the central nervous system. *Neuropathology and applied neurobiology* 28:95-106.
198. Reindl, M., S. Khantane, R. Ehling, K. Schanda, A. Lutterotti, C. Brinkhoff, T. Oertle, M.E. Schwab, F. Deisenhammer, T. Berger, and C.E. Bandtlow. 2003. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *Journal of neuroimmunology* 145:139-147.
199. Jurewicz, A., M. Matysiak, C.S. Raine, and K. Selmaj. 2007. Soluble Nogo-A, an inhibitor of axonal regeneration, as a biomarker for multiple sclerosis. *Neurology* 68:283-287.
200. Hohlfeld, R., M. Kerschensteiner, C. Stadelmann, H. Lassmann, and H. Wekerle. 2006. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurological sciences* 27 Suppl 1:S1-7.
201. Huang, D.W., L. McKerracher, P.E. Braun, and S. David. 1999. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24:639-647.
202. Hauben, E., A. Ibarra, T. Mizrahi, R. Barouch, E. Agranov, and M. Schwartz. 2001. Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal-cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:15173-15178.
203. Merkler, D., T. Oertle, A. Buss, D.D. Pinschewer, L. Schnell, F.M. Bareyre, M. Kerschensteiner, B.S. Buddeberg, and M.E. Schwab. 2003. Rapid induction of autoantibodies against Nogo-A and MOG in the absence of an encephalitogenic T cell response: implication for immunotherapeutic approaches in neurological diseases. *The FASEB journal* 17:2275-2277.
204. Sicotte, M., O. Tsatas, S.Y. Jeong, C.Q. Cai, Z. He, and S. David. 2003. Immunization with myelin or recombinant Nogo-66/MAG in alum promotes axon regeneration and sprouting after corticospinal tract lesions in the spinal cord. *Molecular and cellular neurosciences* 23:251-263.
205. Xu, G., D.Y. Nie, J.T. Chen, C.Y. Wang, F.G. Yu, L. Sun, X.G. Luo, S. Ahmed, S. David, and Z.C. Xiao. 2004. Recombinant DNA vaccine encoding multiple domains related to inhibition of neurite outgrowth: a potential strategy for axonal regeneration. *Journal of neurochemistry* 91:1018-1023.
206. Fontoura, P., P.P. Ho, J. DeVoss, B. Zheng, B.J. Lee, B.A. Kidd, H. Garren, R.A. Sobel, W.H. Robinson, M. Tessier-Lavigne, and L. Steinman. 2004. Immunity to the extracellular domain of Nogo-A modulates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 173:6981-6992.
207. Karnezis, T., W. Mandemakers, J.L. McQualter, B. Zheng, P.P. Ho, K.A. Jordan, B.M. Murray, B. Barres, M. Tessier-Lavigne, and C.C. Bernard. 2004. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nature neuroscience* 7:736-744.
208. Morris-Downes, M.M., K. McCormack, D. Baker, D. Sivaprasad, J. Natkunarajah, and S. Amor. 2002. Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice. *Journal of neuroimmunology* 122:20-33.
209. Kono, D.H., J.L. Urban, S.J. Horvath, D.G. Ando, R.A. Saavedra, and L. Hood. 1988. Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *The Journal of experimental medicine* 168:213-227.

210. Robinson, S.R., G.M. Bishop, H.G. Lee, and G. Munch. 2004. Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiology of aging* 25:609-615.
211. Schenk, D.B., P. Seubert, M. Grundman, and R. Black. 2005. A beta immunotherapy: Lessons learned for potential treatment of Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases* 2:255-260.
212. Orgogozo, J.M., S. Gilman, J.F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L.C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B.F. Michel, M. Boada, A. Frank, and C. Hock. 2003. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61:46-54.
213. Nicoll, J.A., D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham, and R.O. Weller. 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nature medicine* 9:448-452.

CAPÍTULO VIII

Conclusões e Perspectivas Futuras.

O desenvolvimento de terapêuticas antígeno-específicas continua a ser um objectivo perseguido pelos investigadores que se dedicam ao tratamento da Esclerose Múltipla. O principal atractivo desta forma de terapia, é a possibilidade de modificar, de forma selectiva, e com poucos efeitos adversos potenciais, a resposta imune contra o antígeno-alvo do processo autoimune e, dessa forma, impedir a progressão da doença. Por comparação, as formas sistémicas de terapia imunomoduladora são muito menos selectivas, e, naturalmente, acarretam riscos potenciais maiores. No entanto, como vimos anteriormente, apesar da eficácia, provada repetidamente, das terapêuticas antígeno-específicas nos modelos experimentais de desmielinização autoimune, tem sido notoriamente difícil a sua transição para a utilização clínica. Em grande parte, esta dificuldade é devida à nossa ignorância dos mecanismos concretos de geração, e manutenção, da autoimunidade patológica. Por outro lado, ao invés dos modelos experimentais, para os quais são sobejamente conhecidos os antígenos indutores, nas doenças humanas não existem antígenos-alvo claramente identificados. A presença de auto-reactividade contra vários antígenos do próprio é uma realidade praticamente universal; não existem, sequer, diferenças significativas no repertório auto-reactivo entre doentes e saudáveis. Até que sejamos capazes de identificar e pormenorizar as características da resposta autoimune patológica, o objectivo de modificá-la selectivamente será, inevitavelmente, complicado.

A complexidade fisiopatológica desta doença leva, em nosso entender, a que o problema da sua terapia não deva ser simplificado ao ponto de se pensar, somente, em abordagens antígeno-específicas. A par destas, haverá, certamente, lugar à utilização de formas não-específicas de imunomodulação em combinação, sequencialmente, ou em fases mais agressivas da doença. Por outro lado, se alguma vez for possível controlar, de facto, o processo autoimune restará, ainda, resolver o problema da recuperação das lesões existentes, seja da remielinização, seja da regeneração axonal. Existem avanços experimentais significativos nesta área, baseados, por exemplo, na tecnologia de células estaminais, que oferecerão, potencialmente, soluções

terapêuticas relevantes. A abordagem terapêutica futura da EM deverá ser baseada, como tal, num conjunto de agentes destinados a actuar de forma complementar e sinérgica, em diferentes fases da doença.

Procurámos, ao longo deste trabalho, chegar a uma visão abrangente, mas necessariamente reduzida, da evolução dos modelos de imunopatologia e etiopatogenia da Esclerose Múltipla. Em grande medida, o nosso conceito actual da EM como uma doença desmielinizante crónica, inflamatória, e autoimune, é fruto do desenvolvimento do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental. Este modelo, desenvolvido a partir da terceira década do século XX, tornou-se, nos anos subsequentes, na peça central da investigação experimental em doenças desmielinizantes, concentrando todos os esforços dos investigadores. A maioria dos conceitos utilizados para caracterizar a resposta autoimune na EM foi derivada deste modelo experimental: o primado dos antígenos proteicos, a identificação dos determinantes antigénicos, a diversificação de epítomos, o papel central do linfócito T CD4+, o paradigma Th1-Th2, e a relativa irrelevância dos linfócitos T CD8+ e linfócitos B. De forma gradual e inadvertida, a EAE tornou-se quase sinónima de EM para o pensamento neurológico *mainstream*, e só recentemente começaram a ser salientadas as diferenças essenciais entre estas duas patologias. Na EM parece haver uma heterogeneidade histopatológica, baseada em tipos fundamentalmente diferentes de resposta imune; os antígenos não-proteicos começam a ser identificados; não existem epítomos imunodominantes, e o fenómeno de diversificação é menos evidente; as respostas humorais e T_{citotóxica} são, pelo menos, tão importantes como a T_{helper}. Para além disso, em alguns subtipos histopatológicos de doença aguda, bem como nas formas primariamente progressivas, há escassa evidência de participação do sistema imune. Nestas situações, o mecanismo fisiopatológico primário poderá consistir num processo degenerativo do oligodendrócito ou do próprio axónio, e a resposta imune não passar de um epifenómeno sem importância. Comparativamente com a caracterização pormenorizada da resposta imune na desmielinização experimental, existe uma pobreza considerável de estudos imunopatológicos

na doença humana; a principal tarefa futura para investigação nesta área deverá ser, precisamente, a eliminação das lacunas no nosso conhecimento sobre a fisiopatologia e etiopatogenia da EM.

De qualquer forma, a EAE continua a ser o principal instrumento de investigação em terapêuticas experimentais para a EM, e deu-nos, até ao momento, duas terapias aprovadas para utilização em doentes: o acetato de glatiramero, e o natalizumab. Algumas outras terapias fizeram a transição para ensaios clínicos piloto, e de fase I/II, e muitas encontram-se em fase avançada de desenvolvimento pré-clínico. Apresentámos, na primeira parte experimental deste trabalho, dados respeitantes ao desenvolvimento pré-clínico de uma nova forma de terapêutica antigénio-específica, a vacinação tolerizadora com ADNc codificador de proteínas de mielina. Nos modelos de EAE estudados, esta terapia demonstrou eficácia na prevenção e tratamento de formas agudas e crónicas de doença, sobretudo quando em combinação com outras terapias não-específicas baseadas em ADN, como sejam a co-vacinação com ADNc de citocinas Th2, e os oligonucleótidos imunomoduladores. Os nossos resultados permitiram esclarecer alguns dos mecanismos de acção desta terapêutica; isoladamente, a vacinação com ADNc induz anergia linfocitária e, em combinação, leva ao enviesamento Th2 da resposta T, e à redução da diversificação de epítomos da resposta B. No momento presente, foi já completado um ensaio de fase I/II de vacinação com ADNc codificador de MBP, em combinação com atorvastatina, em 30 doentes com EM, cujos resultados parecem confirmar a segurança e tolerabilidade desta terapêutica, bem como indiciar a sua eficácia. Um ensaio de fase II/b está, actualmente, a ser desenvolvido, e espera-se que os seus resultados tragam informação útil sobre o papel eventual das vacinas de ADN no tratamento da EM.

A identificação dos alvos antigénicos da resposta autoimune é, inquestionavelmente, necessária para o desenvolvimento de terapias antigénio-específicas. Na procura destes, vários factores coincidiram para nos orientar a atenção para a proteína Nogo-A. Em primeiro lugar, durante a caracterização da diversificação da resposta humoral na EAE crónica, um

determinante antigénico desta proteína surgiu entre os alvos antigénicos presentes noutras proteínas da mielina. Por outro lado, a importância da Nogo-A para a regeneração axonal, e o desenvolvimento de imunoterapias anti-Nogo, levaram-nos a estudar a indução de respostas imunes contra algumas regiões desta proteína, nomeadamente contra a Nogo-66. Finalmente, o duplo papel que a Nogo poderia desempenhar, como autoantígeno e, ao mesmo tempo, como bloqueador da regeneração axonal, fez-nos pensar que poderia ter importância na fase inflamatória, e degenerativa, da EM. Apresentámos dados, na segunda parte experimental deste trabalho, que confirmam a importância antigénica da Nogo-66 na EAE. Tal como para as outras proteínas da mielina, dependendo do tipo de reacção imune induzido, a Nogo-66 poderá ter um papel como autoantígeno patológico, ou ser alvo de terapêuticas antigénio-específicas benéficas para o tratamento da desmielinização autoimune. Encontramo-nos, neste momento, a realizar estudos para determinar a presença de respostas linfocitárias T anti-Nogo-66 em doentes com EM, em outras doenças neurológicas afectando a substância branca encefálica, e em voluntários saudáveis. Somente após esses resultados serem conhecidos, a importância real desta proteína na imunopatologia da EM poderá ser confirmada. Assim seja o caso, existem várias abordagens terapêuticas com interesse potencialmente grande, não só na EM como, também, para a regeneração axonal em situações como o trauma encéfalo-medular ou a doença cerebrovascular.

Contrariando as duas citações que colocámos no início do nosso trabalho, velhas de meio século e provenientes da era do niilismo terapêutico na EM, encontramos-nos, actualmente, na transição da fase inicial da era terapêutica, para uma fase seguinte, em que, esperamos, surjam várias alternativas para o tratamento desta doença. Na mente do clínico, à consternação resignada perante um novo doente com EM, substituiu-se uma atitude determinada de demanda precoce do diagnóstico, fundamentada na convicção da eficácia das terapias actualmente disponíveis. Existe ainda, no entanto, uma necessidade real de procura de

novas terapias, com maior eficácia na prevenção dos surtos, na redução da incapacidade, e na melhoria da qualidade de vida dos doentes.

Os progressos da Medicina Experimental na compreensão desta doença - para os quais esperamos ter contribuído, embora de forma modesta, com a valia que os nossos resultados apresentem - poderão conduzir, futuramente, à diminuição dessa necessidade. A terapia da Esclerose Múltipla, questão que continua a desafiar o engenho dos investigadores e a habilidade dos clínicos, já evoluiu da fase de incapacidade para a da afirmação – e a esta, esperançosamente, sucederá a da cura.

✧ ÍNDICE REMISSIVO

ΔPLP4	235	<i>antigen arrays</i>	477
“alvo-em-movimento”	192	antigénio FORSSMAN	127
“conceito unificador”	9	antigénio-alvo 32, 64, 221, 231, 259,	
“epitope du jour”	185	261, 573	
“hipótese da higiene”	41	antigénios não-proteicos.....	156, 574
“horror autotoxicus”	58	APL 180, 255, <i>Ver</i> Ligandos Peptídeos	
“neo”-EM	21	Alterados	
“paralisia imune”	226	ARMAND-DELILLE	125
“pecado antigénico original”	185, 189	ARNON	237
“proto”-EM	21	<i>arrays</i> de mielina..... 323, 325, 326, 327,	
“sinais de perigo”	72	328, 329, 336, 337, 364, 368, 476, 478,	
“síndrome carotídeo” de FORSSMAN.....		493	
127		ARTHUS	127, 132
“V-region disease hypothesis”	161	ataque imuno-mediado.....	30
ABREU FREIRE	100	atrofia cerebral	12, 31
acção directa	104, 118	AUJESZKY	115
acetato de glatíramero... 57, 68, 214, 216,		autoantigénio..... 33, 62, 266, 379, 388,	
217, 232, 236, 237, 241, 517, 518, 575		403, 457, 492, 511, 524, 525, 548, 554,	
ACHA-ORBEA.....	161	560, 576	
acidentes neuro-paralíticos 34, 112,		autoimunidade neuroprotectora..... 76,	
114, 116, 117, 119, 120, 124, 125		246, 378, 549	
acidentes pós-vacinais 107, 109, 112,		auto-reactividade patológica 59, 519	
121		avidez do reconhecimento.....	66
acrogoninas	224	azatioprina.....	216
ACTON	113, 115	BABÈS	113, 115, 117
adjuvante completo de FREUND.. 34, 35,		BABINSKI	47, 103, 107
282, 301, 305, 345, 380, 413, 466, 549,		BALÓ	17, 18, 50, 51
552		bandas oligoclonais. 13, 15, 19, 26, 80,	
adrenoleucodistrofia	525	401	
AG	<i>Ver</i> Acetato de Glatíramero	BAREGGI	112
agentes infecciosos. 21, 33, 40, 41, 42, 66,		BARKHOFF.....	23, 24
75, 77, 101, 104, 110, 259, 264, 265		BARNETT.....	52
AHARONI.....	242, 243, 246	<i>Basso-Beattie-Bresnahan rating scale</i>	
ALBUTT	18	540
ALLEN.....	176, 250	BBB..... 540, 551, <i>Ver</i> Basso-Beattie-	
ALMEIDA LIMA	97	<i>Bresnahan rating scale</i>	
alterações cognitivas.....	5, 54	BDNF..... 32, 76, 93, 240, 241, 246, 273,	
altered peptide ligands.....	180, 209, 274	535, 541, 548, 567,	
ALVAREZ-CERMEÑO	15	BEHRING.....	101
ALVORD 138, 141, 143, 146, 226, 227,		BEN-NUN.....	157, 228, 234
228, 236		BERGER.....	15
AMIGO-1.....	532	BERNARD	151, 155
<i>Ver</i> Amphoterin-induced gene and		BERRY	121, 526
ORF-1		BHT-3009.....	517, 563
anafilaxia 68, 114, 126, 128, 130, 137,		bibliotecas de expressão	74, 172
229		BIELEKOVA	172
ansa Nogo-66	529, 530	biomarcadores.....	11, 14, 15, 16, 24
anticorpo IN-1.....	527	bNI-220	528, 564
anticorpos anti-lipídicos	15, 75	BOMBARDA.....	100
anticorpos anti-MBP.....	233, 504	BORDET	101
anticorpos anti-MOG..... 15, 64, 75, 155,		Bordetella pertussis....	136, 151, 380, 466
505		BOSSÙ	498
anticorpos anti-substância nervosa ...	130	BRANDT	122, 130
anticorpos anti-TCR	159, 224	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>	
anticorpos monoclonais	219 <i>Ver</i> BDNF	
anticorpos neutralizantes.....	218, 266	BRINAR	22

BROCKE.....	169, 253
BRÜCK	48, 49, 51
<i>bystander activation</i>	42
<i>bystander suppression</i>	230, 240, 243, 252, 253, 275
<i>Callithrix jacchus</i> ..	64, 90, 156, 203, 235, 540
<i>Callithrix jacchus</i>	64, 235, 540
canabinoides	220
Caracterização histopatológica	47
CARONI.....	527
CARSWELL.....	47, 96, 99
CASPARY	142, 147
CATZ.....	232
CAZZULLO.....	136, 224, 257, 521
células dendríticas.....	72, 73, 187, 259, 262, 263, 432, 473, 474, 506
células estaminais	217, 220, 541, 573
células reguladoras.....	33, 71, 169, 222, 230, 252, 502, 515
células Th3.....	230
sensor tímico	58
CENTANNI	115, 126
CERLETTI.....	224
CHARCOT	22, 47, 54, 96, 97, 99, 102, 103, 377
CHEVASSUT.....	104, 105, 106
CHICHORRO	129
ciclofosfamida	216
citoquinas pró-inflamatórias ..	5, 29, 60, 61, 67, 158, 166, 221, 241, 383, 387, 500, 548, 557, 559
cladribina	219
clones linfocitários ..	152, 157, 158, 164, 169, 170, 182, 187, 354, 412, 428, 429, 472, 498, 501, 557
CNPase	62, 65, 75, 321, 324, 365, 420, 424, 477, 557, 570
COHEN.....	157, 228
<i>combinatorial peptide libraries</i> ..	172, 208
complexo axoglial.....	534
complexo trimolecular .	78, 157, 159, 170, 182, 191, 193, 223, 241, 249, 493, 501
complexos MHC-Ag	234
COMPSTON	21
CONFAVREUX	8, 9
consulta de EM	215
copolímero-1.....	236, <i>Ver</i> Acetato de Glatiramer
COUTINHO	70
CpG	73, 263, 266, 276, 277, 342, 345, 346, 347, 350, 351, 352, 353, 354, 357, 358, 360, 361, 364, 366, 368, 370, 371, 372, 373, 498, 499, 504, 513, 514, 516, 521, 561, <i>Ver</i> Sequências CpG
critérios de diagnóstico... 7, 14, 22, 24, 26	
critérios de WITEBSKY-ROSE	58
<i>cross-presentation</i>	230, 261
<i>cross-priming</i>	230, 262, 263
CRUVEILHIER	47, 96, 99
curiosos clínicos	6, 34, 97, 286, 310, 368
DAVIDOFF	126
DAWSON	19, 107
degenerescência de apresentação.....	181
degenerescência de reconhecimento ...	66, 176, 193, 241, 244, 249
degenerescência do TCR.....	174
DELEZENNE	125
demência	543
desmielinização autoimune. 77, 379, 380,	395, 457, 573, 576
desmielinização perivascular ...	114, 121, 127
determinantes.....	<i>Ver</i> Epítopos
determinantes antigénicos	143, 149, 152, 153, 158, 164, 392, 456, 524, 525, 555, 574
determinantes crípticos.....	183
DEVIC.....	8, 17, 18, 20, 50, 51, 156, 163
diagnóstico	7, 11, 12, 13, 14, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 74, 75, 96, 97, 100, 104, 188, 194, 196, 218, 525, 545, 546, 576
diagnóstico diferencial.....	11, 25, 27, 28
diversificação de determinantes.....	33, 184, 186, 187
diversificação de epítopos ..	31, 33, 66, 73, 158, 170, 182, 184, 186, 188, 191, 192, 193, 235, 304, 309, 321, 322, 324, 326, 328, 329, 330, 337, 379, 412, 413, 418, 420, 421, 423, 426, 428, 431, 492, 512, 514, 520, 554, 556, 557, 559, 574, 575
diversificação intermolecular	67, 184, 321, 365, 417
diversificação intramolecular	67, 184, 190, 309, 321, 417, 431
doença de Lyme	25, 75, 105, 174
doença imuno-mediada... 31, 56, 58, 77,	216, 266
doenças desmielinizantes ..	11, 16, 17, 19, 21, 24, 41, 47, 48, 49, 76, 107, 110, 121, 124, 128, 131, 133, 136, 137, 139, 142, 154, 156, 161, 304, 305, 309, 345, 377, 379, 522, 548, 574
doutrina neuronal.....	526
DUDA.....	244
EAE 34, 35, 36, 47, 57, 60, 61, 62, 63, 64,	65, 67, 68, 69, 71, 72, 74, 75, 78, 84, 91, 125, 128, 131, 132, 134, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 148, 149, 151, 153, 155, 157, 158, 160, 161, 162, 163, 167, 169, 170, 171, 175, 177, 183, 184, 186, 187, 188, 193, 197, 199, 201, 203, 210, 211, 214, 223, 224, 226, 227, 228, 231, 232, 234, 235, 237, 238, 239, 243, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253,

257, 266, 267, 269, 270, 271, 272, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 352, 353, 354, 357, 358, 359, 362, 363, 364, 365, 368, 370, 371, 377, 379, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 403, 404, 405, 409, 412, 417, 424, 426, 428, 431, 441, 443, 445, 446, 447, 448, 450, 452, 453, 456, 457, 464, 466, 468, 471, 484, 492, 493, 494, 496, 497, 499, 501, 503, 506, 507, 508, 509, 511, 514, 515, 516, 517, 521, 523, 524, 525, 534, 550, 551, 552, 553, 554, 556, 560, 561, 562, 563, 574, 575, Ver Encefalomielite Autoimune Experimental <i>early onset Multiple Sclerosis</i>19 EBERS8 EBV 21, 43, 44, 45, 61, 75, 242, Ver Vírus de EPSTEIN-BARR EDSS....6, 8, 79, 255, 517, Ver <i>Expanded Disability Status Scale</i> efrinas526 EICHORST38 EMAD 17, 19, 20, 26, 28, 41, 42, 46, 49, 238, Ver Encefalomielite Aguda Disseminada EMDM..... 20, Ver Encefalomielite Disseminada Multifásica EM-PP..... 6, 8, 9, Ver Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva EM-PS.... 6, 8, 9, Ver Esclerose Múltipla Progressiva com Surto EM-SP... 6, 9, 51, Ver Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva EM-SR..... 6, 7, 8, 9, 33, 51, 65, 232, Ver Esclerose Múltipla por Surto e Remissões encefalomielite aguda disseminada17, 109, 114, 121, 131, 238 encefalomielite alérgica121 encefalomielite autoimune experimental 33, 34, 35, 116, 266 encefalomielite disseminada multifásica20 encefalomielites pós-infecciosas ..57, 109, 120, 121, 124, 125 <i>encephalitis periaxialis scleroticans</i> ...102 epidemias de EM41 Epilepsia 194, 547 epítipo críptico.....181 epítipo imunodominante.... 64, 65, 164, 167, 168, 182, 183, 185, 189, 235, 244, 281, 424, 431, 503, 510 EPSTEIN-BARR..... 19, 21, 36, 43 erro de diagnóstico.....13 Esclerose Disseminada.....98, 105, 106 Esclerose em Placas.....97, 98, 100, 103, 104, 105, 194 esclerose lateral amiotrófica545 esclerose mesial do hipocampo.....542 Esclerose Múltipla benigna.....7 esquizofrenia.....224, 541, 543 estatinas.....219, 516 estirpes endogâmicas..... 141, 151, 170 estrogénios40, 219, 220 estudos epidemiológicos33, 40, 42, 44 etiologia 33, 36, 42, 44, 48, 62, 101, 103, 104, 107, 110, 112, 114, 123, 125, 132, 137, 139, 140, 216 etiopatogénese 12, 41, 46, 47, 57, 58, 60, 63, 77, 78, 104, 108, 110, 111, 138, 192, 193, 214, 228, 554 etiopatogenia 102, 121, 124, 131, 142, 162, 220, 574 EVAVOLD250 <i>Expanded Disability Status Scale</i>6 EYLAR 148, 149, 150, 226, 228 factores ambientais33, 34, 40 factores de prognóstico8 fadiga4, 216 família <i>Reticulon</i>528 FARQUHAR BUZZARD.....105 fase inflamatória.....576 fase progressiva8, 9, 33, 54 FASSO171 FATHMAN.....171, 464 FERRAN112 FERRARO . 124, 126, 128, 132, 136, 224, 257, 521 FERREIRA DE MOURA96, 99 FIELD142, 147 fingolimod219 fisiopatologia..... 14, 29, 47, 48, 216, 266, 326, 524, 546, 553, 575 focagem isoeléctrica13 focalização antigénica.....191 FOLCH-PI.....64, 144 formas familiares.....38 formas óptico-espinhais.....20 FORSSMAN.....127 FoxP370 fraccionamento da substância nervosa139 FRANÇA112 FRERICHES96, 99 FREUND. 130, 131, 134, 136, 140, 225, 378, 549, 553 FRIDKIS-HARELI242, 247

- FROMANN47, 103, 107
 FURTADO109, 129
 GAULT18
gene gun263, 502
gene therapy258
 genômica 16, 48, 218, 452, 519
 GLANZMANN110
 glioma.....546, 547, 569
 GONZALES112
 GOVERMAN.....161
 GpG 346, 347, 350, 351, 352, 353,
 354, 357, 358, 360, 361, 364, 365, 366,
 368, 370, 371, 498, 501, 513, 514, 516,
 523, 561, *Ver* Oligonucleótidos
 imunomoduladores
 GUILLAIN-BARRÉ5, 113
 GUTH.....122, 130, 138
 H-2 34, 242, 254, 408, 502, 525
 HAFLER164
Hap-Map37
 HARVEY113, 115
 HASHIM149, 150
 HAUBEN549, 551
 HAUSER156
 HEMMER166, 174
 Herpesvírus19, 42, 43
 herpesvírus 6 humano.....43
 HERV43, *Ver* Human Endogenous
 Retrovirus
 heterogeneidade patológica 47, 48,
 50, 52
 HHV-6 43, *Ver* Herpesvírus-6 humano
 história natural.....6, 7, 9, 33, 45
 HLA..... 37, 38, 39, 57, 62, 63, 64, 85, 86,
 89, 91, 92, 152, 167, 170, 171, 178,
 182, 183, 189, 192, 193, 205, 206, 207,
 209, 210, 212, 233, 242, 245, 247, 249,
 253, 254, 270, 272, 274, 280, 381, 396,
 400, 401, 402, 505, 524
 hmTAP236, *Ver* Human multitarget
autoantigen protein
 HO220, 221, 346, 493, 514
 HOEGYES113
 HOOD159
horror autotoxicus.....58, 89, 90, 114
 HUANG.....549, 550
 human endogenous retrovirus43
 IDO..... *Ver* Indoleamina Dioxigenase
 IGEV *Ver* Imunoglobulinas Endovenosas
 IgG-NMO18
 imunodominância 66, 171, 184, 189
 imunoglobulinas endovenosas.....57, 216
 imunomoduladores .. 7, 57, 218, 219, 230,
 235, 240, 249, 259, 338, 341, 342, 346,
 353, 354, 357, 359, 361, 362, 363, 364,
 368, 370, 371, 493, 498, 499, 516, 517,
 518, 521, 575
 imunopatologia 33, 47, 61, 522, 574,
 576
 imunossupressores 57, 217, 219, 227, 518
 IN-1 527, 537, 540, 544, 547, 564, 567,
 569, *Ver* Anticorpo IN-1
 indoleamina deoxigenase220
 INFβ *Ver* Interferão beta
 inibidores da regeneração axonal..... 376,
 526
 inibidores mielínicos..... 537, 539, 546,
 554, 558, 559
 interferão beta 7, 57, 68, 215, 216,
 217, 218, 231, 506
 ISHII118, 119
 isoimunização135
 JERVIS124, 126, 127, 128, 135
 KABAT.....12, 131, 132, 133, 134, 521
 KANTER.....75
 KARIN253
 KARNEZIS552, 553, 554
 KERCHENSTEINER246
 KIBLER139, 146, 148, 149, 150
 KIES.....141, 145, 146, 147, 225, 227
 KOPELOFF126, 131, 138
 KORITSCHONER116, 119
 KOZAK.....260, 457, 459, 480
 KRIKORIAN.....112, 113, 114, 116, 119
 KROGSGAARD74, 165, 175
 KUCHROO159, 161, 162
 KUHN104, 105
 KUMAR169, 188, 502
 KURTZKE.....3, 6, 41
 KUTZELNIGG.....54
 LAFAILLE68, 161, 162
 LANDRY.....113, 116
 LASSMANN48, 49, 51
 LAVERAN.....111, 112
 LCR *Ver* Líquido Cefalorraquidiano
 LEBAR154
 LEES64, 144, 147, 153, 159
 LEHMANN183
 lesão prefagocítica52
 leucoencefalite aguda hemorrágica.....132
 leucoencefalite hemorrágica.... 20, 133,
 142, 345, *Ver* Leucoencefalite aguda
 hemorrágica
 leucomalácia periventricular ... 534, 542,
 547
 LHERMITTE4
 ligando peptídeo alterado “universal”.....
 240
 ligandos peptídeos alterados 174, 180,
 223, 249, 251, 267, 379, 520
 linfócito B.....74
 linfócitos NK-T CD1d+ Vα24-JαQ70
 linfócitos T 30, 31, 32, 33, 38, 39, 55,
 59, 60, 61, 62, 64, 67, 68, 70, 72, 73,
 76, 134, 151, 156, 158, 223, 228, 230,

- 231, 234, 240, 244, 245, 247, 250, 252, 253, 254, 256, 259, 263, 280, 281, 283, 284, 301, 303, 305, 314, 330, 336, 345, 347, 349, 361, 364, 387, 427, 428, 441, 443, 449, 451, 468, 473, 474, 496, 497, 504, 509, 511, 514, 550, 552, 557, 574
linfócitos T CD8+ Qa-1 restritos70
LINGO-1 532, 565, *Ver LRR and Ig domain containing, Nogo receptor interacting protein*
LININGTON.....154
líquido cefalorraquidiano ... 5, 11, 12, 16, 104, 106, 139, 164, 319, 518
LISAK164
LOBELL.....371, 372, 523, 561
LUBLIN6, 151
LUCCHINETTI48, 49, 51, 52
LUMSDEN.....23, 137, 146, 225
MACHADO100
MADSEN167
MAG ... 31, 49, 50, 51, 55, 62, 65, 69, 75, 76, 164, 220, 309, 310, 313, 314, 328, 331, 337, 339, 340, 357, 365, 368, 370, 376, 378, 396, 397, 398, 399, 402, 418, 423, 424, 461, 474, 475, 476, 484, 492, 512, 523, 526, 531, 533, 537, 546, 547, 550, 551, 557, 558, 560, 565, 569, 570
manifestações iniciais.....4
MARBURG 17, 18, 22, 49, 102, 110
MARTIN39, 165, 172, 174
MARTINS DA SILVA.....39
MBP ... 15, 33, 35, 62, 63, 64, 65, 68, 69, 75, 89, 92, 152, 153, 154, 157, 158, 160, 161, 163, 164, 166, 168, 179, 180, 181, 182, 183, 187, 188, 190, 205, 206, 207, 210, 223, 226, 228, 231, 232, 234, 235, 237, 238, 239, 241, 243, 245, 246, 248, 253, 255, 270, 271, 274, 303, 309, 310, 313, 314, 320, 323, 324, 328, 331, 334, 336, 337, 339, 340, 357, 365, 368, 370, 372, 377, 396, 397, 398, 399, 402, 409, 418, 423, 424, 465, 474, 475, 476, 477, 479, 484, 492, 498, 499, 502, 504, 512, 517, 520, 523, 524, 533, 534, 557, 560, 563, 575
MCALPINE.....7, 23, 110
MCDEVITT.....252
MCDONALD.....23, 24
MCKERRACHER526
MECHNIKOV101
MERKLER.....550
MERZBACHER102
metotrexato.....216
micofenolato mofetil219
microglia 30, 32, 52, 55, 72, 73, 92, 165, 273, 548
mielina oral.....231, 236
mielite transversa. 19, 20, 36, 117, 156, 167
MILLER.....22, 184
mimetização molecular 45, 46, 61, 66, 77, 170, 174, 177, 193
mímica molecular33, 45, 396
mitoxantrona57, 216
MIYAGAWA118, 119
MOBP.....62, 65, 320, 365, 368, 477
modelo animal 33, 34, 160, 258, 266, 547
modelo-padrão 29, 31, 33, 36, 40, 42, 45, 47, 57, 77, 214, 216, 266, 513
MOG..... 15, 32, 33, 35, 62, 64, 75, 81, 154, 155, 163, 165, 166, 167, 188, 190, 203, 206, 211, 234, 235, 239, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 313, 314, 320, 322, 323, 324, 328, 331, 337, 338, 339, 340, 341, 357, 365, 368, 369, 370, 377, 395, 396, 397, 398, 399, 402, 418, 423, 424, 461, 465, 474, 475, 476, 477, 479, 484, 492, 497, 505, 506, 507, 509, 511, 515, 518, 523, 524, 552, 553, 554, 557, 560, 569
MORGAN.....131, 133, 134, 521
MP4.....235
MSRV.....43, 86, 105, 195, *Ver Multiple Sclerosis Retrovirus*
MUKHOPADHYAY.....526
MULLER103, 107, 112, 122, 130
Multiple Sklerose98, 194
não-respondedores.....218
natalizumab.....219, 222, 268, 519, 575
NBI-5788.....255, 275
NEUHAUS.....244
neurodegenerativo2, 9, 29
neuromielite.....18, 22, 50, 65, 156, 163
neuromielite óptica...18, 22, 65, 156, 163
neuroquímica143, 144, 156
nevrite óptica18, 20, 34, 163
NgR528, 530, 531, 532, 535, 537, 540, 541, 543, 544, 546, 547, 548, 551, 568, *Ver Receptor NgR*
NI-250527
NiG529, 530, 531, 549, *Ver Amino-Nogo*
NK-T61, 71, 92, 230, 515, 516
NMO.....18, 20, 83, *Ver Neuromielite óptica*
Nogo-66378, 379, 381, 388, 389, 390, 392, 393, 395, 396, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 406, 408, 409, 412, 413, 420, 422, 424, 426, 427, 430, 445, 446, 457, 458, 459, 460, 461, 474, 480, 487, 525, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 540, 542, 544, 546, 547, 550, 551, 552, 554, 555, 557, 559, 560, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 576

- Nogo-A..... 55, 75, 76, 220, 267, 365, 368, 375, 376, 378, 379, 381, 382, 386, 387, 390, 395, 396, 400, 401, 402, 403, 409, 457, 458, 459, 461, 464, 467, 475, 476, 479, 480, 487, 524, 528, 529, 530, 531, 533, 534, 536, 537, 539, 541, 543, 544, 545, 547, 548, 550, 551, 552, 554, 559, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 575
- OEG..... 541, *Ver Olfactory ensheathing glia*
- OFFNER.....160, 168
- OKSENBERG.....168
- olfactory ensheathing glia*.....541
- oligodendropatia.....49, 50, 51
- oligonucleotide arrays*.....16
- oligonucleótidos..... 266, 345, 346, 350, 351, 354, 493, 498, 499, 513, 514, 516, 521, 575
- oligonucleótidos imunomoduladores..521
- OLITSKY..... 135, 143, 144, 151, 153
- OMgp..... 31, 55, 220, 475, 476, 526, 533, 537, 558, 565
- OPPENHEIM.....107, 108
- OSP..... 62, 65, 75, 321, 365, 423, 424, 477, 557, 570
- OTA.....164, 167
- p75.....532, 565
- padrões neuropatológicos.....49, 51
- PAMP..... 72, 258, *Ver Pathogen-Associated Molecular Patterns*
- parabiose.....140
- PASTEUR.....101, 111, 117
- PATERSON.....61, 134, 138, 140, 141, 145, 157, 227
- Pathogen-Associated Molecular Patterns*.....258
- patologia axonal.....48, 377, 383
- PATY.....38
- PELIZAEUS.....102
- perda axonal..... 29, 31, 47, 48, 54, 69, 377, 541, 552
- persistência clonal.....190
- pertussis*..... 161, 163, 167, 243, 305, 381, 445, 466, 552, 553
- PETINELLI.....151, 157
- PETTE.....110, 165
- PFEIFFER.....101
- phage display*.....74, 172
- PIERRE MARIE.....22, 42, 102, 104, 105
- placa desmielinizante ...2, 32, 47, 48, 61, 220, 254
- placas-sombra.....30
- plasmaferese.....217
- PLP..... 33, 35, 62, 64, 69, 153, 154, 160, 163, 164, 166, 183, 184, 186, 188, 231, 234, 235, 243, 271, 281, 283, 297, 299, 300, 309, 310, 313, 314, 320, 322, 323, 324, 328, 331, 337, 339, 340, 357, 365, 370, 377, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 402, 417, 418, 423, 424, 427, 443, 445, 453, 474, 475, 476, 477, 484, 492, 506, 507, 510, 512, 517, 523, 524, 557, 560, 562
- Portugal.....3, 39, 78, 85, 99, 129
- POSER.....22, 24
- positional scanning concept*.....173
- potenciais evocados.....13, 23
- PPAR.....220, 221, *Ver Receptores Nucleares*
- primariamente progressiva.....6, 9, 23
- PRINEAS.....52
- procedimento de KIES.....146
- processo de MERRIFIELD.....149
- prognóstico..... 2, 7, 8, 14, 15, 24, 75, 86, 113, 233, 324, 380, 525, 536, 539
- progressiva com surtos.....6
- proteína A1.....148, 149, 226
- proteínas básicas.....139, 145, 153, 226
- proteoglicanos.....526
- proteolípido.....144, 153
- proteômica.....16, 48
- pseudosklerose*.....102
- PURVES-STEWART.....106
- PUTNAM.....108, 110, 125
- quimiodominância.....171
- RAMON Y CAJAL.....376, 526
- reacção de hipersensibilidade do tipo ARTHUS.....126
- reactividade cruzada..... 33, 66, 174, 175, 176, 181, 239, 243, 244, 245, 252, 255, 408, 426, 431, 553, 556, 557
- receptor NgR.....530, 532, 533, 542, 547
- receptor X hepático.....220
- receptores glutamatérgicos.....220
- receptores nucleares PPAR.....220
- receptores *Toll-like*.....61, 258
- recidivante-remitente.....6, 187
- reconhecimento degenerado.... 174, 175, 240, 244, *Ver Degeneração de reconhecimento*
- recrescimento axonal...55, 220, 267, 376, 389, 400, 526, 528, 533, 534, 543
- regeneração aberrante.....540, 542
- regeneração axonal..... 31, 55, 76, 220, 376, 378, 379, 381, 383, 389, 526, 527, 530, 533, 536, 538, 539, 548, 549, 554, 558, 559, 573, 576
- regeneração pós-traumática... 539, 541, 558
- REINDL.....548
- REINGOLD.....6
- remielinização.....31, 48, 55, 56, 219, 573
- REMLINGER.....112, 113, 115
- repertório linfocitário .. 39, 64, 161, 162, 171, 186, 560

- repertório V β 168, 169, 443, 444, 502, 556
- resíduos-âncora 178, 181
- resíduos-contacto 176, 178, 181, 251, 253, 254
- respondedores 218
- respondedores-parciais 218
- Ressonância Magnética Nuclear 7, 11, 217, 518
- restrição de repertório 157, 159, 160, 162, 167, 521
- restrição promíscua 182
- restrição V β 159, 168, 169
- reticulon homology domain* 528
- retrovírus 42, 105
- RICHEL 101
- RIDGWAY 171
- RINDFLEISCH 47, 96, 97, 99, 103, 107, 109
- RIO 39, 73
- RIVERS 121, 123, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 143, 521
- RMN Ver Ressonância Magnética Nuclear
- ROBOZ 145, 148
- ROKITANSKY 96, 99
- RUIZ 248, 296, 479
- SÁ 3, 13
- SCHILDER 20, 102
- SCHUMACHER 22, 26
- SCHWAB 376, 527
- SCHWARTZ 246, 378
- SCHWEINBURG 116, 119
- SCHWENTKER 121, 123, 125, 130, 143
- SCI ... 7, 15, 24, 28, 74, 217, 218, 525, Ver Síndromas Clínicos Isolados
- screenings* genômicos 37
- secundariamente progressiva .. 6, 7, 9, 52
- VERGAL 126
- SELA 237
- semaforinas 526
- SENA 143
- sequências CpG 72, 258, 260, 317, 341, 344, 345, 500, 504
- SERCARZ 169, 181, 183
- shadow plaques 30
- SHAW 225, 227
- SICOTTE 550
- sinais e sintomas 2, 3, 12, 30, 98
- síndromes clínicos isolados 7, 16
- sintomas paroxísticos 4
- SLOAN-LANCASTER 250
- soros neurotóxicos 126
- SOSPEDRA 39, 174
- Spherula insularis* 106, 195
- spotted microarrays* 16, 75, 246, 318, 319, 322, 380, 420, 422, 512, 554, 557
- sprouting* axonal 534, 540, 550
- SPRUNT 121
- STADELMAN 246
- standard model* 29
- STEINER 104, 105
- STEINFELD 122, 130
- STEINMAN 152, 158, 168, 185, 192, 233, 248, 251, 253, 280, 501, 515
- STERN 135, 248
- STROMINGER 176
- STRUMPELL 102, 103, 107, 109
- STUART 112, 113, 114, 116, 119
- substância branca de aparência normal 12, 48, 54
- subversão imune 181
- superantígenos 43, 169
- supressão antígeno-específica 224
- surtos ... 2, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 23, 30, 34, 35, 36, 41, 58, 60, 76, 97, 133, 151, 155, 157, 183, 184, 188, 191, 216, 217, 218, 231, 234, 238, 255, 292, 304, 309, 310, 311, 314, 315, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 336, 337, 339, 345, 353, 355, 357, 368, 377, 426, 492, 493, 496, 497, 500, 503, 509, 511, 514, 517, 523, 525, 577
- surtos e remissões 34, 232, 238
- SVET-MOLDAVSKAYA 225
- SVET-MOLDAVSKY 225
- SWANBORG 226, 227
- synthetic combinatorial libraries* 173
- TABIRA 153
- TAJ 532, 565
- TAL 143, 144, 153
- técnica de FOLCH e LEES 144
- técnicas de *prime-boost* 264
- teoria esferulítica 104, 106
- terapêutica imunomoduladora .. 129, 215, 520
- terapêuticas antígeno-específicas 129, 170, 182, 192, 214, 228, 231, 236, 267, 305, 492, 503, 509, 519, 522, 560, 573, 575, 576
- terapêuticas imunomoduladoras .. 57, 214
- terapia sintomática 216
- terapias antígeno-específicas ... 191, 221, 519, 521, 524, 575
- Th1 21, 30, 32, 41, 60, 61, 66, 67, 68, 71, 90, 172, 187, 222, 230, 239, 244, 246, 250, 255, 262, 272, 281, 284, 285, 287, 292, 293, 300, 303, 304, 316, 318, 333, 334, 337, 342, 344, 345, 346, 348, 349, 350, 358, 360, 363, 365, 372, 410, 412, 443, 444, 445, 468, 486, 495, 497, 498, 499, 505, 509, 512, 513, 514, 516, 517, 521, 550, 556, 559, 562, 563, 574
- Th2 21, 30, 32, 41, 50, 60, 67, 68, 70, 90, 110, 187, 222, 223, 228, 230, 239,

241, 243, 245, 250, 252, 253, 255, 262, 264, 270, 272, 273, 275, 280, 285, 287, 288, 292, 293, 300, 301, 303, 304, 305, 315, 318, 332, 334, 338, 342, 343, 348, 349, 350, 354, 358, 360, 363, 365, 366, 368, 371, 372, 409, 412, 443, 444, 445, 468, 486, 492, 493, 495, 497, 498, 500, 502, 509, 511, 514, 516, 525, 550, 553, 554, 556, 559, 561, 562, 563, 574, 575	493, 494, 496, 502, 504, 507, 508, 509, 513, 514, 516, 521, 551
Th3 70, 222, 230, 231, 246, 270, 272	vacinação com células T 219, 223, 519, 520
Th17 69	vacinas de ADN 192, 257, 259, 260, 262, 263, 265, 280, 281, 283, 284, 285, 289, 292, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 315, 316, 317, 318, 326, 328, 329, 336, 337, 341, 342, 344, 354, 359, 361, 362, 363, 364, 366, 368, 369, 379, 457, 458, 459, 468, 477, 479, 482, 484, 487, 492, 494, 497, 499, 502, 503, 506, 509, 511, 513, 514, 515, 519, 520, 522, 523, 551, 575
THEILER 41, 70, 185, 500	VALENTINER 97, 99
<i>Theiler murine encephalomyelitis vírus – inflammatory demyelinating disease</i> 500	VAN BOGAERT 110
TLR 61, 71, 72, 258, 346, 499, <i>Ver</i> Receptores <i>Toll-like</i>	VAN NOORT 66
TMD <i>Ver</i> Terapias Modificadoras de Doença	VANDENBARK 157, 168
TMEV-IDD 70, 185, 187, 500, 523	VANDERLUGT 184
tolerância oral 223	variantes clínicas 20
tolerização imunológica 141	variantes geográficas 20
tolerização oral ... 228, 230, 231, 232, 519	vasculite 127
TONEGAWA 162	vasculopatia 127
TONNI 112, 114	VILLAR 76
Tr1 70	VIRCHOW 73, 97, 102
transferência adoptiva 61, 68, 70, 76, 140, 151, 153, 155, 157, 167, 183, 184, 188, 243, 252, 301, 302, 380, 431, 441, 445, 446, 447, 449, 450, 452, 549, 556	VIRCHOW-ROBIN 73
transgênicos 36, 62, 63, 157, 160, 161, 162, 166, 177, 190, 247, 252, 347, 349, 379, 464, 545, 547	vírus de EPSTEIN-BARR 43
TRAPP 48, 55, 377	VON JAUREGG 104
tratamento farmacológico 215	VULPIAN 96, 97, 99, 102
trauma medular 376, 378, 383, 457, 460, 536, 538, 539, 540, 560	WAKSMAN 144, 153
Tregs 70, 92	WARREN 232
tríade de CHARCOT 97	WEINER 33
TROY 532, 565	WEINSHENKER 8
Tumores 547	WEKERLE 157, 162
TUOHY 153, 185, 188, 192	WESTON HURST 20, 120, 132, <i>Ver</i> Leucoencefalite aguda hemorrágica
UHTHOFF 4	WESTPHAL 102, 109
vacinação anti-rábica 34, 107, 111, 117, 119	WILDBAUM 494, 496
vacinação com ADN ... 194, 257, 258, 259, 262, 264, 265, 267, 280, 282, 284, 285, 291, 293, 294, 297, 302, 304, 306, 309, 315, 316, 318, 342, 343, 345, 346, 354, 357, 358, 364, 368, 369, 370, 371, 426,	WINDHAGEN 253
	WINGERCHUCK 18
	WITEBSKY 58, 122, 125, 130, 138
	WOLFF 258
	WUCHERPFENNIG 167, 176, 178
	XU 232, 551
	YOUSSEF 494, 496
	ZAMVIL 152, 158, 180
	ZHANG 166
	ZIEMSEN 246
	α -B Cristalina 63, 557

∞ NOTAS



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE LISBOA
2006